

THÈSES

présentées pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(diplôme d'État)

par

Jean MICHON

LICENCIÉ ès-SCIENCES

ANCIEN INTERNE EN PHARMACIE

1^{re} THÈSE

LE PLEUROMUCOÏDE

ISOLEMENT ET ÉTUDE DE LA COPULE GLUCIDIQUE

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues devant la Commission d'examen

M. COURTOIS Président

M. PIETTE Professeur sans chaire

M. MALANGEAU Maître de Conférences



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548802_0063

THÈSES

présentées pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(diplôme d'État)

par

Jean MICHON

LICENCIÉ ès-SCIENCES
ANCIEN INTERNE EN PHARMACIE

1^{re} THÈSE

LE PLEUROMUCOÏDE
ISOLEMENT ET ÉTUDE DE LA COPULE GLUCIDIQUE

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues devant la Commission d'examen

M. COURTOIS	Président
M. PIETTE	Professeur sans chaire
M. MALANGEAU	Maitre de Conférences



FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. René FABRE, *Doyen*, Membre de l'Institut
MM. JANOT, *Assesseur*, G. CUVIER, *Secrétaire Général*
M. L. JEANDEL, *Secrétaire*
Doyen Honoraire: M. RADAIS

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DELEPINE et LEBEAU, Membres de l'Institut.
LAUNOY, FLEURY, MASCRE, PICON.

PROFESSEURS

MM. FABRE, Membre de l'Institut ..	Toxicologie (T.).
JANOT	Pharmacie galénique (T.).
VALETTE	Pharmacodynamie (T.).
BEDEL	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T.).
PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T.).
GUILLOT	Physique (T.).
GAUTIER	Chimie organique (T.).
Mlle LAMBIN	Microbiologie (T.).
MM. RAOUL	Zoologie appliquée (T.).
COURTOIS	Chimie biologique (T.).
DOMANGE	Chimie minérale (T.).
CRETE	Botanique (T.).
TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle (T. P.).
MORETTE	Hydrologie (T.).
CAVIER	Parasitologie (T. P.).
QUEVAUVILLER	Hygiène (T.).
MOREAU	Chimie analytique (T.).
GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T. P.).
GERMAN	Technique bactériologique.
PIETTE	Biologie sanguine.
N.	Pharmacie chimique (T.).

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. DEYSSON	Cryptogamie.
MALANGEAU	Biochimie.
FLAHAUT	Minéralogie.
RENAULT	Chimie organique.
DILLEMANN	Biologie végétale.
GIRARD	Chimie analytique.
LARUELLE	Physique.
LE MOAN	Toxicologie.
ROSSIGNOL	Pharmacodynamie.
N.	Pharmacie galénique.
N.	Pharmacie chimique.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. BORY	Sérologie.
CORRIEZ	Physique.
DESVIGNES	Microbiologie.
GARDENT	Chimie analytique (1 ^{re} année).
GESTEAU	Physique biologique.
HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique.
HENRY	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e années).
LECLERC	Chimie biologique.
Mlle LONGUEVALLE	Service des examens de Chimie.
PELLERIN	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e années).
PERCHERON	Chimie (4 ^e année).
POTTIER	Pharmacie galénique industrielle.
Mlle ROLLEN	Biologie végétale.
SAVEL	Parasitologie.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M. GOUTAREL	Chef de Travaux de Pharmacotechnie galénique.
Mlle MORIN	Chef de Trav. de Pharmacodynamie.
M. LUSINCHI	Chef de Trav. de Pharmac. chimique.

BIBLIOTHÈQUE

Conservateur, chargé de la Direction : M. GARNIER

Conservateur : Mlle LAVAUD

Bibliothécaires : Mmes DESGRIPPES et KREHMER

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J.-E. COURTOIS,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien Chef des Hôpitaux de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur

*qui a bien voulu suivre nos recherches
avec une constante bienveillance et accepté
la présidence de cette thèse.*

*En témoignage de notre profonde gra-
titude et de notre respectueux attachement.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PIETTE,
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien Chef des Hôpitaux de Paris

A MONSIEUR P. MALANGEAU,
Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine

*qui ont bien voulu faire partie de notre
jury de thèse.*

*Avec l'expression de notre vive gra-
titude.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR R. BOURRILLON,
Maître de Conférences à l'École Nationale de Médecine
et de Pharmacie de Tours

*qui nous a proposé le sujet et guidé dans
notre travail.*

*En témoignage de notre profonde gra-
titude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. ARNAUD,
Professeur à l'École Nationale de Médecine
et de Pharmacie de Tours

*qui nous a accueilli dans son laboratoire
et nous a accordé toutes facilités pour
poursuivre nos recherches.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR E. ARON,
Directeur de l'École Nationale de Médecine
et de Pharmacie de Tours

A MES MAÎTRES DE L'ÉCOLE NATIONALE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE TOURS.

*Avec l'expression de mon respectueux
dévouement.*

A LA MÉMOIRE DE MES PARENTS,

A MA FEMME,

A MA FILLE,

A MON FRÈRE, LE PROFESSEUR AGRÈGÉ R. MICHON,

A MA FAMILLE,

A MES AMIS,

A TOUS CEUX QUI FORMENT
L'ÉQUIPE DU LABORATOIRE DU
CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL
DE TOURS POUR LEUR AIDE GENE-
REUSE ET EFFICACE

INTRODUCTION

La présence des glucides dans certaines protéines comme groupement prosthétique est une notion qui, malgré son ancienneté, n'a été admise qu'après de multiples travaux, si bien que NEUBERGER (42) en 1938 a consacré une partie d'un de ses mémoires à la démonstration de la présence réelle de ces substances comme partie intégrante de la molécule. Et pourtant, depuis cinquante ans, l'hydrolyse de certaines protéines ne laissait pas de doute sur la présence de sucres réducteurs et d'osamines. Le premier, ZANETTI (69), isole en 1903 la glucosamine sous forme de dérivé tétrabenzoylé. Mais c'est surtout BIERRY (3-4-5-6) qui confirme les travaux de ZANETTI et met en évidence le mannose et le galactose. Par la suite, de nombreux auteurs (19-27-37-48-49) isolèrent ces mêmes glucides par hydrolyse des protéines sériques. Il faut attendre 1952 pour voir WERNER et ODIN (65) séparer l'acide sialique de la glycoprotéine alpha I et mettre en évidence, par chromatographie sur papier, un composé à migration rapide que WALDRON (59) identifie au fucose. La présence de ces glucides, en quantité plus ou moins importante suivant l'origine de la protéine isolée, amena les auteurs à la notion de glycoprotéine, hétéroprotéine dont le groupement prosthétique est de nature polysidique.

Or, parmi cet ensemble qui devait par la suite se révéler si complexe, une catégorie de mucoprotéines fut rapidement individualisée, tant par ses caractères de solubilité que par sa thermostabilité. Ainsi, se trouvait décrit le séromucoïde par ZANETTI (68-69) : en fait, le produit était très impur puisqu'il correspondait à la totalité du filtrat déprotéinisé par la chaleur. Quelques années plus tard, RIMINGTON (48-49-50) consacrait un certain nombre de travaux à l'étude de cette mucoprotéine : Il l'isolait par fractionnement alcoolique du filtrat obtenu suivant la technique de ZANETTI et révélait la présence d'une importante copule glucidique. Par des techniques différentes, WINZLER et ses collaborateurs (62-66),

puis SCHMID (53), isolaient du sérum une substance riche en glucides qui était très voisine, sinon identique, au séromucoïde de RIMINGTON. Ainsi, trois vocables différents séromucoïde, orosomucoïde et alpha 1 glycoprotéine acide se révélaient être assimilables à une seule et même protéine dont le taux dans le sérum humain normal était voisin de 300 à 400 mg/l. On s'aperçut alors rapidement que cette concentration s'élevait souvent de façon considérable, comme celle des glycoprotéines totales dans un certain nombre d'états pathologiques, reflétant presque toujours un syndrome inflammatoire. Ce fait fut à la base d'un nombre considérable de travaux dont il serait impossible de rapporter la bibliographie, mais qui eut au moins l'avantage de concentrer l'intérêt des chercheurs sur cette catégorie de protéines.

L'état inflammatoire se caractérisait donc par une élévation du sucre protidique, mais surtout par l'augmentation des séromucoïdes, soit du type alpha 1, soit du type alpha 2 représentés principalement par l'haptoglobine.

Ce résultat posait alors le problème de l'origine et peut-être du rôle de ces protéines. Il devenait donc indispensable de rechercher la présence de séromucoïdes en d'autres lieux que le sérum, par exemple, dans les tissus et surtout dans certains liquides biologiques apparaissant au cours des phénomènes inflammatoires.

Si, dans le premier cas, nos connaissances sont encore très fragmentaires et ne permettent pas, à l'heure actuelle, de conclusions certaines, une étude plus poussée a été réalisée dans le second sur les liquides inflammatoires.

Le liquide synovial a été investigué par SCHMID (54) : après digestion par la hyaluronidase de liquides provenant de malades atteints de rhumatismes articulaires, il fractionne par la méthode 10 de COHN (14) et met en évidence dans le groupe 6 une alpha 1 glycoprotéine acide identifiée à l'orosomucoïde de WINZLER (67 bis) par la méthode immunochimique.

Les glycoprotéines du liquide pleural ont d'autre part été étudiées en dosant le sucre protidique total (12). En fait, c'est surtout la notion de protéines totales qui a retenu tout d'abord l'attention en ce domaine, et permis de distinguer, entre deux catégories d'épanchements, les transudats et les exsudats, ces derniers caractérisée par une concentration en protéines supérieure à 30 g/l. En 1946, BOURRILLON (12) montrait que ce type d'épanchement était caractérisé par la présence d'un taux élevé de sucres protidiques et, par la suite, en 1951, retrouvait un séromucoïde, qui présentait des caractères voisins de celui qui était présent dans le sérum.

Par la technique d'électrophorèse sur papier, il était alors possible de mettre en évidence l'élévation de la fraction alpha 2 globuline, de retrouver les mêmes frontières que dans le sérum et dans des proportions respectives voisines. Ainsi, chez le même

sujet, le spectre protéique était-il pratiquement identique dans le sérum et dans le liquide pleural. Toutefois, cette conclusion était seulement fondée sur la méthode d'électrophorèse et, si l'on pouvait conclure à la similarité, il était impossible d'affirmer l'identité intime des protéines dans ces deux milieux biologiques.

Or, la réponse à un tel problème est d'importance, car si l'on peut admettre l'identité dans le cas d'une transudation, force est d'envisager un autre phénomène dans le cas de l'exsudat. Ainsi, se trouve de nouveau posé le problème de la présence de ces glycoprotéines, et plus particulièrement de leur origine tissulaire, et l'on serait tenté de rapporter les glycoprotéines du liquide pleural à l'épithélium pleural stimulé alors par un phénomène infectieux. Le problème devient voisin de celui des protéines urinaires dont l'origine sanguine ne peut être affirmée qu'après leur isolement et leurs caractérisations.

Les glycoprotéines du liquide pleural sont-elles identiques ou non à celles du sérum ? Dans le cas d'une réponse affirmative, y a-t-il une origine commune, vraisemblablement de nature tissulaire, car il est exclus qu'elles puissent passer de l'un à l'autre liquide par un phénomène de dialyse, la barrière semi-perméable des épithéliums s'y opposant ?

Dans le but d'apporter une contribution à cet important sujet, nous nous sommes proposés dans ce travail :

- de mettre en évidence une mucoprotéine du type séro-mucoïde dans les liquides pleuraux ;
- de l'isoler à l'état pur ;
- et de réaliser l'étude d'un de ses caractères essentiels, la copule glucidique, en réservant, pour des travaux ultérieurs, l'étude des caractères physiques.

PLAN DE TRAVAIL

Pour réaliser cette étude, nous avons été amené :

— A modifier certains détails des techniques connues pour répondre aux exigences nécessitées, tant par les déterminations spectrophotométriques (élimination de troubles ou de colorations gênantes), que par la mise en œuvre des méthodes d'électrophorèse sur papier (coloration) et de chromatographie sur papier (séparation quantitative des sucres neutres et aminés) ;

— A séparer à l'état pur une des mucoprotéines pleurales, en mettant en œuvre le relargage connu au sulfate d'ammonium, les précipitations perchlorique et sulfosalicylique, mais en insistant tout spécialement sur la purification finale du produit, ce qui a pu être réalisé par un fractionnement alcoolique qui nous est propre ;

— A déterminer les différents constituants glucidiques de la copule glucidique et les rapports relatifs par rapport à l'un d'entre eux pris comme référence (le fucose), ce qui a exigé l'étude approfondie des conditions de l'hydrolyse totale par les acides de cette substance complexe ;

— De tenter enfin, à l'aide des résultats expérimentaux alors obtenus, une comparaison avec les séromucoïdes connus, pour voir s'il y avait ou non similitude.

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

CHAPITRE PREMIER

ANALYSE ÉLÉMENTAIRE

Les éléments suivants ont été déterminés :

1. *Azote par la méthode de Kjeldahl*, en employant comme catalyseur de minéralisation le mélange sélénium et sulfate de potassium. La distillation a été effectuée dans l'appareil de PARNAS et WAGNER.

2. *Phosphore par la méthode de Briggs* (13), après destruction sulfonitrique pour le phosphore total et hydrolyse formique en tube scellé pour l'acide phosphorique.

3. *Soufre par la précipitation du sulfate de baryum* et mesure néphélométrique, après oxydation nitrique pour le soufre total et hydrolyse formique pour l'acide sulfurique.

CHAPITRE II

DOSAGE DES PROTÉINES

Suivant la quantité de protéines contenues dans les échantillons, deux méthodes sont utilisées :

- *Technique de Gornall*, pour les dosages sur 2 à 10 mg ;
- *Technique de Lowry*, pour les déterminations sur 5 à 100 microgrammes.

Les mesures de l'absorption lumineuse sont faites au spectrophotomètre Beckman, modèle B, dans les conditions que nous préciserons à chaque cas, comparativement à un essai à blanc.

MÉTHODE AU BIURET.

L'addition à une solution de protéines de sels de cuivre en milieu alcalin produit une coloration violette stable, dite « réaction du biuret », due à la formation de complexes cuivriques et donnée par toutes les substances présentant plusieurs liaisons peptidiques.

Décrites par RIEGLER (47) en 1914, la première méthode pratique fut adaptée par KINGSLEY (31) en 1939, puis modifiée par plusieurs auteurs, en particulier GORNALL (26), qui mit au point le réactif cuprotartrique.

Toutefois, pour tenir compte des causes d'erreurs qui se sont produites au cours de nos premières investigations, nous avons été amené à modifier légèrement les conditions habituelles pour les raisons suivantes :

- Nous précipitons les protéines, non par l'alcool absolu, mais par le mélange alcool-éther, afin d'éliminer les lipides ;

- Malgré ces précautions, le réactif de GORNALL (26) donne dans certains cas un trouble. Ayant constaté la disparition de celui-ci par l'addition de complexon 3, nous avons alors remplacé le sel de Seignette par ce produit ;
- Les mucoprotéines étant très solubles dans l'alcool, nous ajoutons une quantité du mélange alcool-éther dans le rapport de 10 pour 1.

Réactifs

1° Mélange alcool-éther :

Alcool absolu pur.....	4 volumes
Ether pur	1 —

2° Soude 0,10 N.

3° *Réactif de Gornall modifié :*

Sulfate de cuivre, à 5 OH ₂	1,50 g
Complexon 3	6 —
Iodure de Potassium.	1 —
Soude 2,5 N	300 ml
Eau distillée, q.s.p.....	1 000 —

Le flacon est conservé à l'obscurité.

4° Étalonnage.

Il se fait avec une solution de sérum-albumine humaine (livrée par le Centre de Transfusion Sanguine), qui est dosée préalablement par la méthode de KJELDAHL.

A l'aide de ce standard, on prépare une série de dilutions (avec une solution isotonique de chlorure de sodium) de concentrations échelonnées de 0 à 10 g/l.

Mode opératoire

— Dans un tube à centrifuger, on introduit une quantité de liquide déterminée par des essais préalables et telle qu'elle contienne de 4 à 6 mg de protéines. On lui ajoute du sérum physiologique pour amener son volume à 1 ml. En remuant avec un agitateur très fin, on verse alors lentement 10 ml du mélange alcool-éther. Après repos d'une demi-heure, on centrifuge pendant une dizaine de minutes. Le précipité est alors lavé deux fois de suite par 10 ml du mélange éthéro-alcoolique et, après décantation, on retourne le tube pour égoutter sur du papier filtre ;

— Le précipité est dissous dans 1 ml de soude 0,10 N et on laisse digérer une dizaine de minutes pour assurer la dissolution totale. Après l'addition de 3 ml du réactif de GORNALL, on soumet à l'agitation et on laisse reposer 20 mn.

— La coloration est mesurée en petite cuve à 550 mμ.

MÉTHODE DE LOWRY (34)

Ce procédé permet la détermination de très petites quantités de protéines, soit en solution, soit après précipitation alcoolique. La couleur finale résulte de :

- la réaction au biuret des protéines avec les sels de cuivre en milieu alcalin ;
- la réduction du réactif de FOLIN-CIOCALTEU par la tyrosine et le tryptophane.

Réactifs

1° Solution cupro-alcaline :

- a) Carbonate de sodium anhydre à 2 % dans la soude 0,10 N.
- b) Sulfate de cuivre (à 5 molécules d'eau) à 0,5 % dans une solution de tartrate double de sodium et potassium à 1 %.
- c) Au moment de l'utilisation, mélanger 50 ml de a) avec 1 ml de b).

2° Solution carbonate-cuivre, identique à la précédente, sauf l'omission de soude.

3° *Réactif de Folin-Ciocalteu* (24).

Dans un flacon de 2 l, muni d'un réfrigérant à reflux, on introduit successivement :

Tungstate de sodium.	100 g
Molybdate de sodium.	25 -
Eau distillée.	700 ml
Acide phosphorique 85 %.	50 -
Acide chlorhydrique concentré.	100 -

et on porte à l'ébullition pendant 10 h.

Après refroidissement, on ajoute 150 g de sulfate de lithium et 50 ml d'eau distillée, puis, après dissolution, quelques gouttes de brome pour éliminer les effets des substances réductrices pouvant être présentes. L'excès de brome est alors éliminé en faisant bouillir pendant une quinzaine de minutes et, après refroidissement, on complète à 1 l et on filtre : la solution obtenue doit être jaune et non verdâtre.

Avant son emploi, le réactif doit être titré par la soude, puis dilué environ à un demi, pour le rendre acide IN.

1° Etalonnage.

On prépare une série de dilutions de sérum-albumine humaine (avec une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1 000) à des concentrations comprises entre 25 et 500 microgrammes par ml.

Mode opératoire

— A un échantillon de 5 à 100 microgrammes de protéines dans 0,2 ml placé dans un tube de 5 ml, on ajoute, en mélangeant bien, 1 ml de la solution cupro-alcaline. On laisse reposer pendant 10 mn à la température du laboratoire ;

— On introduit alors rapidement *0,10 ml* du réactif de Folin, et on laisse reposer une demi-heure ;

— La lecture est faite en petite cuve, à 750 $m\mu$ pour les faibles concentrations, et à 500 $m\mu$ pour les fortes concentrations.

Remarques

Dans les cas où la protéine est déjà en solution diluée, on peut prendre 0,5 ml du liquide et ajouter 0,5 ml du réactif cupro-alcalin de concentration double.

Cette réaction est très sensible, environ 100 fois celle du biuret, et se révèle supérieure à la détermination directe par l'absorption à 280 $m\mu$.

La coloration est différente suivant les protéines étudiées, puisque leur concentration en tyrosine est variable.

Après le fractionnement par le sulfate d'ammonium, la dialyse doit être totale car ce sel diminue la coloration.

CHAPITRE III

DOSAGES DES HEXOSES LIÉS AUX PROTÉINES

De nombreux travaux ont révélé la présence de sucres engagés en combinaison avec les protéines (3-4-5-6-12-19-28-35). La nature a été successivement mise en évidence par les techniques chimiques (osazones), puis par la technique chromatographique, tant sur papier que sur colonne, qui a confirmé les résultats précédents (présence de galactose et de mannose) et révélé le fucose.

Les méthodes de dosages se répartissent en deux groupes, selon que l'on dose directement les sucres liés aux protéines, ou que l'on hydrolyse préalablement les glycoprotéines.

A) *TECHNIQUES DIRECTES*

Elles consistent à faire agir des réactifs à base d'acide sulfurique qui assurent l'hydrolyse lors du chauffage, en même temps que la réaction colorée se développe en présence de l'une des substances suivantes : l'anthrone, le tryptophane, le carbazole ou l'orcinol.

Nous avons choisi la méthode à l'orcinol sulfurique de LUSTIG et LANGER (36) qui est la plus employée pour l'étude des glucides liés aux protéines et qui sert de référence.

B) *TECHNIQUES INDIRECTES*

Le sucre lié est libéré après scission des complexes protéiniques par l'action des acides étendus et chauds. Ces méthodes sont nécessaires pour étudier les conditions de l'hydrolyse et doser les substances glucidiques après élution des bandes chromatographiques.

La méthode de BERTRAND, modifiée par BIERRY (7), fut très employée, mais elle nécessitait une quantité importante de liquides biologiques pour le dosage. Aussi, avons-nous utilisé la méthode de NELSON-SOMOGYI, excellente pour les microdosages.

Toutefois, l'inconvénient de ces techniques est que tous les corps réducteurs sont dosés, en particulier le fucose et les osamines. Si l'on désirait faire le dosage des sucres neutres, il faudrait les séparer des sucres aminés par passage sur colonne de Dowex 50 suivant le procédé de BOAS (11). Cette technique a été abandonnée, car il nous est possible de déterminer avec précision le fucose par la technique de DISCHE, et les osamines par la technique de BLIX.

MÉTHODE DE LUSTIG ET LANGER MODIFIÉE PAR WEIMER ET MOSHIN (61)

Par action de l'acide sulfurique concentré et à chaud, les hexoses se déshydratent, avec production d'alpha-hydroxyméthylfurfural instable, qui se condense avec l'orcinol en donnant un composé orangé.

La modification apportée à la technique de ces auteurs consiste dans le fait que, de même que dans le dosage des protéines, nous précipitons celles-ci par le mélange alcool-éther.

Réactifs

1. Alcool-éther (4/1).
2. Soude 0,10 N.
3. Orcinol.

Les premiers dosages furent faits avec l'orcinol Merck pur pour chromatographie : c'était une poudre jaune très claire. Malheureusement, nous avons dû par la suite employer un produit d'une autre origine et une purification nécessaire fut effectuée.

Après solubilisation de 5 g d'orcinol dans l'éther éthylique anhydre, 1 g de charbon activé Norit est ajouté. Après agitation, la solution est filtrée deux fois sur papier Whatman n° 1, lavé préalablement à l'éther. Après deux lavages de l'éther par 10 ml d'eau distillée, le liquide est évaporé à froid sous ventilation (une coloration rose passe dans la couche aqueuse). Finalement, le résidu est desséché sous vide, pendant 48 h.

4. *Réactif à l'orcinol sulfurique.*

a) Solution acide :

Acide sulfurique concentré Merck	60 ml
Eau distillée.	40 ml

b) Solution d'orcinol :

Orcinol purifié	1,6 g
Eau distillée.	100 ml

- c) Solution extemporanée, faite dans un bain d'eau glacée :
 Solution acide 7,5 volumes
 Solution d'orcinol..... 1 —

5. Solution étalon de galactose-mannose à parties égales.
 100 microgrammes galactose (pour 1 ml Soude 0,10 N
 100 microgrammes mannose)

Mode opératoire

— Dans un tube à centrifuger conique, on introduit une quantité de liquide biologique ou de fraction protéinique correspondant à 100-300 microgrammes du mélange galactose-mannose, puis 10 volumes de la solution éthero-alcoolique. On agite et on laisse reposer une demi-heure. Après centrifugation de 10 mn. on lave deux fois le précipité par 10 ml d'alcool-éther, on centrifuge à nouveau et on décante ;

— Le précipité est dissous dans 1 ml de soude 0,10 N ;

— 4 tubes sont utilisés, dont deux pour le dosage, 1 pour l'essai à blanc et 1 pour la solution étalon, qui sont placés dans un bain d'eau glacée :

	Tubes 1 et 2 protéines	Tube 3 étalon = 200 gamma	Tube 4 essai à blanc
Soude 0,10 N	0	0	1 ml
Etalon	0	1 ml	0
Solution de protéines ...	1 ml	0	0
Réactif (4 c) refroidi à 0°	8,5 ml	8,5 ml	8,5 ml

Après refroidissement convenable, les tubes sont agités avec précaution et fermés par un très petit entonnoir en pyrex dont la pointe est tournée vers l'intérieur du tube. On porte au bain-marie à 80°, pendant 15 mn exactement, et on laisse refroidir :

— La mesure est faite en petite cuve, à 540 mμ.

Remarques

On utilise une solution étalon à parties égales de galactose-mannose, car ces deux hexoses sont retrouvés en quantités presque équivalentes dans la plupart des glycoprotéines seriques. Toutefois, lorsque la nature du ou des hexoses aura été identifiée, on utilisera de préférence comme étalon le sucre ou le mélange de glucides dans les proportions trouvées par le dosage après séparation chromatographique.

Etant donné que les densités optiques varient avec les substances glucidiques, un dosage préalable est réalisé pour déterminer la quantité de protéines qui contient 100 à 300 γ du mélange étalon.

Pour éviter l'erreur due à une coloration, même faible, de la fraction protéinique après sa solubilisation par la soude, il est toujours fait un essai à blanc sans orcinol que l'on retranche de la mesure.

Il est nécessaire de faire un essai préalable avec différents acides sulfuriques en présence d'orcinol et de la solution étalon de galactose-mannose, car certains acides donnent des colorations brunes orangées aberrantes. Nous avons choisi l'acide sulfurique concentré Merck (pur pour analyse), car les résultats obtenus avec lui furent toujours constants.

Lors de l'addition du réactif à l'orcinol sulfurique à la solution de protéines dans la soude 0,10 N, un dégagement important de chaleur se produit et des colorations brunes peuvent apparaître, ce qui rend le dosage impossible. Pour remédier à cet inconvénient, nous effectuons le mélange dans un bain d'eau glacée avec la solution sulfurique préalablement refroidie à 0°.

Afin d'éliminer les variations de température importantes du bain-marie à 80°, lors de l'introduction des tubes à réaction, nous utilisons une cuve en verre contenant trois litres d'eau portée à 80° avec un brassage continu du liquide au moyen d'un agitateur métallique.

A la longueur d'onde de 540 m μ , les méthylpentoses et les osamines ne présentent pas d'absorption mais l'arabinose peut interférer et la détermination des hexoses est dans ce cas entachée d'erreur.

MÉTHODE DE NELSON-SOMOGYI (41-55)

Les oses et les holosides réducteurs réduisent exclusivement en milieu alcalin et à chaud les sels de cuivre, pour donner un précipité jaune d'hydroxyde cuivreux, qui réduit le réactif arsénomolybdique avec formation proportionnelle de bleu de molybdène.

Réactifs

1. Solution cupro-alcaline.

a) Sulfate de cuivre cristallisé à 15 %.

b) Solution alcaline :

Carbonate de sodium anhydre.....	25 g
Carbonate acide de sodium	20 —
Tartrate sodico-potassique.	25 —
Eau distillée	1 000 ml

c) Solution extemporanée :

Réactif a.	1 volume
Réactif b.	25 —

2. Solution d'arsénomolybdate.

On dissout 25 g de molybdate d'ammonium pulvérisé dans 150 ml d'eau distillée, auxquels on ajoute 21 ml d'acide sulfurique

concentré, puis 25 ml d'une solution à 12 % d'arséniate de sodium cristallisé. La solution, maintenue à 37° pendant 48 h, est centrifugée pour éliminer les corps précipités et conservée dans un flacon brun bouché à l'émeri à l'abri de la lumière.

3. Solution étalon de glucides à 1 % dans l'eau distillée :
- d. Mannose
 - d. Galactose
 - l. Fucose

Ces trois produits Hoffman-la-Roche ont été desséchés pendant 48 h, sous vide, avant de préparer leurs solutions.

Mode opératoire

— Dans un tube à réaction, on introduit 0,5 ml d'hydrolysât chlorhydrique ou sulfurique. Après neutralisation par la soude 5 N, on ajoute la quantité d'eau distillée nécessaire pour obtenir 1 ml puis 1 ml du réactif cupro-alcalin. On porte au bain-marie bouillant pendant 20 mn exactement.

— Après refroidissement complet, on y verse 1 ml de la solution d'arsénomolybdate, on agite et on complète à 10 ml avec l'eau distillée.

— La lecture est effectuée en petite cuve, à 500 m μ pour les faibles dilutions, et à 660 m μ pour les fortes dilutions.

Remarques

Connaissant par la technique à l'orcinol le pourcentage de galactose-mannose lié à la protéine, et par la technique de Brix la quantité d'osamines, on s'arrange pour que l'hydrolysât contienne 50 à 100 microgrammes de substances réductrices.

Pour éliminer les interférences dues à l'action possible des sels sur le réactif cupro-alcalin, les solutions étalon des différents glucides sont faites dans les acides utilisés pour l'hydrolyse et neutralisées par la soude au moment du dosage.

Par cette technique, on détermine en même temps le fucose et les osamines dont le pouvoir réducteur par rapport au galactose est le suivant :

Mannose	100 %
Fucose	66 %
Glucosamine	106 %

CHAPITRE IV

DOSAGE DES MÉTHYLPENTOSE

La présence du fucose dans les glycoprotéines fut démontrée par DISCHE et OSNOS (21), WALDRON et WOODHOUSE (58-59). Pour la détermination quantitative, la technique de DISCHE et SHETTLIS (20) est employée. Cependant, cette méthode dosant à la fois le fucose et le rhamnose, une chromatographie est nécessaire pour déterminer lequel de ces deux sucres se trouve dans les glycoprotéines étudiées.

Par addition d'acide sulfurique concentré, tous les glucides donnent des dérivés du furfural, à l'exception des osamines. Par addition de cystéine, de nouveaux composés sont produits, présentant des absorptions caractéristiques suivant les oses étudiés.

Réactifs

1. Acide sulfurique dilué :

Acide sulfurique concentré Merck	6 volumes
Eau distillée	1 —

2. Réactif à la cystéine :

Chlorhydrate de cystéine	3 g
Eau distillée	100 ml

3. Etalon de fucose à 20 microgrammes par millilitre.

Mode opératoire

— Dans deux tubes, on introduit 1 ml d'une solution aqueuse de protéines, dont la concentration correspond à 10 microgrammes environ de fucose, et les met à refroidir dans un bain d'eau glacée. On leur ajoute 4,5 ml d'acide sulfurique, dilué et refroidi à 0°, en agitant tout doucement afin d'éviter un dégagement trop brusque de chaleur.

— On prend deux autres tubes dont l'un contient 1 ml d'eau distillée pour l'essai à blanc, et l'autre 1 ml de la solution étalon de fucose. On leur ajoute 4,5 ml d'acide sulfurique dilué, en agitant lentement dans un bain d'eau contenant de la glace.

— On retire les tubes du bain de glace et, après repos de 10 mn à la température ambiante, on les plonge dans un bain-marie bouillant pendant 10 mn exactement.

— Après refroidissement à 0°, on ajoute 0,1 ml du réactif à la cystéine dans l'essai à blanc, l'étalon et l'un des tubes contenant la solution de protéines. L'autre tube « protéines » servira à corriger la coloration non spécifique.

— On retire les tubes du bain d'eau glacée et on les abandonne 24 h à la température ambiante.

— La mesure est faite en petite cuve à 396 m μ et 430 m μ , un témoin eau distillée servant de zéro.

— On calculera la quantité de fucose en employant la formule suivante :

$$\frac{(\text{DO}_{396 \text{ m}\mu} - \text{DO}_{430 \text{ m}\mu}) - (\text{DO}_{t 396 \text{ m}\mu} - \text{DO}_{t 430 \text{ m}\mu})}{(\text{DO}_{st 396 \text{ m}\mu} - \text{DO}_{st 430 \text{ m}\mu})} \times \frac{2}{p} = \% \text{ Fucose}$$

dans laquelle :

p = mg mucoprotéine contenu dans 1 ml de solution.

DO = Densité optique.

DO_t = Densité optique de l'essai à blanc.

DO_{st} = Densité optique de l'étalon.

Remarques

La densité optique est proportionnelle à la concentration de fucose de 2 à 50 microgrammes par millilitre.

Les coefficients d'extinction du fucose et du rhamnose sont presque identiques avec la technique utilisée.

Un dosage préalable est toujours effectué afin d'obtenir une quantité de fucose d'environ 10 microgrammes dans la prise d'essai, ce qui correspond dans la plupart des cas à 500-1 000 microgrammes de glycoprotéines pures.

Le fucose a été utilisé comme étalon, car c'est le seul méthylpentose que nous avons rencontré dans la mucoprotéine étudiée dans ces recherches.

La réaction donnée par le fucose et le rhamnose avec la cystéine est très lente et atteint son maximum à partir de la sixième heure : elle est stable pendant 24 h. L'interférence possible, due aux pentoses, est éliminée par ce procédé, car la réaction, intense dans les quinze premières minutes, décroît rapidement et devient nulle.

Les deux mesures à 396 m μ et 430 m μ sont basées sur le fait que l'absorption est maximum à 400 m μ et minimum à 430 m μ . Pour ces deux longueurs d'ondes, les hexoses donnent la même

absorption et les pentoses une courbe horizontale. Toutefois, une interférence faible subsiste, si les mesures sont faits après deux heures ; les pourcentages en fucose sont alors plus bas et ne correspondent pas aux dosages effectués après hydrolyse et séparation chromatographique. Aussi, toutes les mesures photométriques sont faites après un temps de réaction de 24 h.

CHAPITRE V

DOSAGE DES OSAMINES

La technique de BLIX (10) est utilisée après l'étude systématique de l'hydrolyse (voir 3^e partie, chap. I). En effet, suivant les auteurs, l'acide chlorhydrique est utilisé à des normalités très différentes (1 à 6 N) et pendant des temps très variables (3 à 18 h). Il est impossible d'employer une méthode standard d'hydrolyse pour effectuer ce dosage.

Après acétylation des osamines libérées, et formation de cycles « oxazolique » ou « pyrrolique » en milieu alcalin, l'addition du réactif d'EHRLICH donne un dérivé rose.

Réactifs

1. Soude 5 N.
2. Réactif à l'acétylacétone :

Acétylacétone Merck	0,75 ml
Carbonate de Sodium 1,25 N.....	25 ml
3. Réactif d'EHRLICH :

p. Diméthylaminobenzaldéhyde	1,6 g
Acide chlorhydrique concentré	30 ml

Au moment du dosage, on ajoute 30 ml d'éthanol R.P. à 95 °.
4. Alcool absolu Prolabo R.P.
5. Solutions étalon, contenant 50 et 100 microgrammes de glucosamine par millilitre.

Mode opératoire

- L'hydrolysât chlorhydrique de 10 mg de protéines est neutralisé par la soude 5 N en présence d'une goutte de solution de phtaléine de phénol à 1 p. 10 000 et ramené à un pH acide par l'acide chlorhydrique 0,01 N. On ajuste le volume à 20 ml avec

l'eau distillée, en sorte que 2 ml de la solution obtenue correspondent à 1 mg de protéines hydrolysées.

— Dans deux tubes fermés à l'émeri, on introduit 2 ml de la solution d'hexosamines à titrer. Dans trois autres tubes, on ajoute dans le premier 2 ml d'eau distillée pour l'essai à blanc, et dans le deuxième et le troisième, 2 ml des solutions étalon.

— A l'ensemble de ces tubes, on verse 2 ml du réactif à l'acétyl-acétone, on bouche, et on porte pendant 20 mn à 96°, c'est-à-dire à douce ébullition pour éviter l'évaporation de l'acétylacétone.

— Après refroidissement, on ajoute 20 ml d'éthanol à 95°, et tout en agitant, 2 ml du réactif d'EHRlich. On ferme et on laisse reposer 1 h à l'obscurité.

— La lecture est faite en cuve de 50 mm à 530 m μ .

Remarques

BLIX a modifié la technique d'ELSON et MORGAN (22) après avoir étudié l'influence de la normalité du carbonate de sodium, la concentration d'acétylacétone, la température et le temps de chauffage, afin d'obtenir les conditions optima du dosage des osamines.

La loi de Beer est suivie pour des concentrations inférieures à 130 microgrammes. BLIX utilise deux temps de chauffage lors de l'action du réactif à l'acétylacétone sur les osamines libres : 20 mn pour un taux inférieur à 90 microgrammes et 60 mn pour une dose de 90 à 130 microgrammes. C'est la raison pour laquelle nous déterminons toujours par un dosage préalable la quantité de mucoprotéines contenant 50 à 100 gamma d'osamines, afin de fixer le temps de chauffage à 20 mn.

Les résultats sont présentés par rapport à la glucosamine. Par cette technique, les coefficients d'extinction sont les mêmes pour la d.glucosamine et la d.galactosamine. Cependant, seule la chromatographie nous permettra de déterminer les rapports entre les deux sucres aminés.

La présence du chlorure de sodium dans les hydrolysats diminue l'intensité de la coloration. Aussi, est-il nécessaire de faire les solutions étalon dans le même acide chlorhydrique que celui utilisé lors de l'hydrolyse et de neutraliser celles-ci dans les mêmes conditions de neutralisation des hydrolysats.

CHAPITRE VI

DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE

Suivant les auteurs, cet acide a reçu plusieurs noms (acide neuraminique, acide gynaminique, acide lactaminique) : ce sont des corps très voisins, dont l'identité n'est ni prouvée ni infirmée. Sa nomenclature n'est pas encore précisée. Il contient souvent un radical acétyl ou glycolyl. De nombreuses méthodes furent développées, utilisant le réactif de BIAL à l'orcinol chlorhydrique, la diphénylamine (DISCHE), le tryptophane perchlorique ou le réactif d'EHRlich.

Nous avons utilisé deux techniques.

A. — MÉTHODE DE SVENNERHOLM (56)

Une étude très approfondie a été faite en 1956 par cet auteur en employant le réactif de BIAL.

En présence d'orcinol chlorhydrique, l'acide sialique donne une coloration orangée intense augmentée par action de sulfate de cuivre et extraite par l'alcool isoamylique.

Réactifs

1. Orcinol chlorhydrique :

Orcinol purifié	0,20 g
Acide chlorhydrique Merck (d = 1,19)	80 ml
Sulfate de cuivre 0,1 M	0,25 ml
Eau distillée, q.s.p.	100 ml

Ce réactif doit être préparé au moins 4 h avant son usage.

Il peut être conservé au frigidaire pendant une semaine.

2. Réactif dit blanc, identique au précédent, mais sans orcinol.

3. Alcool isoamylique Prolabo R.P.

4. Acide sialique standard.

Un échantillon d'acide n.acétylsialique, offert par SVENNERHOLM (1) nous a permis de déterminer la quantité d'acide sialique contenu dans une mucoprotéine de référence et qui fut utilisée pour tous les dosages.

Mode opératoire

— Dans trois tubes bouchés à l'émeri, on introduit 2 ml d'échantillon contenant 10 à 40 microgrammes d'acide sialique (dosage préalable). Les deux premiers tubes reçoivent 2 ml du réactif de BIAL modifié, le troisième 2 ml du réactif dit blanc. On porte au bain-marie bouillant pendant 15 mn exactement, puis on laisse refroidir dans un bain d'eau glacée.

— On ajoute 5 ml d'alcool isoamylique, on agite vigoureusement et on remet dans le bain glacé pendant une dizaine de minutes. Après centrifugation, on replonge les tubes dans le bain de glace pendant une demi-heure.

— La mesure est faite en petite cuve à 575 m μ et 680 m μ , en employant l'alcool isoamylique pour obtenir le zéro de référence.

— On calculera la quantité d'acide sialique en employant la formule suivante :

$$\frac{DO_{575 \text{ m}\mu} - DO_{680 \text{ m}\mu}}{DO_{\text{st } 575 \text{ m}\mu} - DO_{\text{st } 680 \text{ m}\mu}} \times \frac{2}{p} = \% \text{ acide sialique}$$

dans laquelle :

DO = Densité optique, correspondant à l'acide sialique contenu dans p mg de protéines.

DO_{st} = Densité optique, correspondant à 20 microgrammes d'acide sialique.

B. — MÉTHODE A LA DIPHÉNYLAMINE (20)

La réaction à la diphenylamine pour les déoxypentoses a été utilisée en 1948 par NIAZI et STATE (13). WERNER et ODIN (64-65) modifièrent la technique pour déterminer l'acide sialique du sérum et de diverses glycoprotéines. Nous utilisons la méthode donnée par WINZLER (66) et la modifions légèrement en tenant compte du fait que les mucoprotéines sont très solubles dans l'acide trichloracétique.

(1) Nous adressons nos remerciements chaleureux à M. le Pr SVENNERHOLM, de l'Université de Göteborg, qui a bien voulu nous faire don des échantillons d'acides n.acétylsialique et n.glycolysialique.

Réactifs

1. Acide trichloracétique à 5 % (T.C.A.)
2. Réactif acide :
 - Acide acétique glacial 90 ml
 - Acide sulfurique concentré 10 ml
3. Réactif à la diphénylamine (D.P.A.) :
 - Diphénylamine 1 g
 - Réactif acide 100 ml
4. Acide sialique étalon : 10 mg d'acide n. acétylsialique sont dissous dans 100 ml de T.C.A. Au moment du dosage, cette solution est diluée au 1/10 :
 - 5 ml = 50 microgrammes d'acide sialique
5. Solution de mucoprotéines : 10 mg pour 100 ml T.C.A.
 - 5 ml = 500 microgrammes de mucoprotéines

Mode opératoire

— Dans un tube bouché à l'émeri, on introduit 5 ml de la solution diluée étalon et, dans un autre analogue, 5 ml de la solution de mucoprotéines.

— On porte au bain-marie bouillant pendant 15 mn exactement, puis on laisse refroidir et on filtre si cela est nécessaire.

— On prend 5 autres tubes bouchés à l'émeri, dans lesquels on mélange les doses suivantes de réactif :

	Mucoprotéines		Acide sialique Étalon		Essai à blanc
	1	2	3	4	5
Mucoprotéine	2 ml	2 ml	0	0	0
Acide sialique	0	0	2 ml	2 ml	0
T.C.A.	0	0	0	0	2 ml
D.P.A.	4 ml	0	4 ml	0	4 ml
Réactif acide	0	4 ml	0	4 ml	0

— Après séjour de 30 mn au bain-marie bouillant, on laisse refroidir les tubes et on constate la présence d'une coloration bleue violacée.

— La mesure est faite en petite cuve à 530 m μ .

— On calcule en employant la formule suivante :

$$\frac{DO_1 - DO_2 \times 10}{DO_3 - DO_4} = \% \text{ acide sialique}$$

dans laquelle les numéros correspondent à ceux des tubes contenant la solution de mucoprotéine et l'acide sialique étalon.

CHAPITRE VII

DOSAGE DES ACIDES URONIKES

L'étude de ces acides est délicate, car les liaisons glycuronosidiques sont très stables et les acides uroniques libérés très labiles. Dans la technique de TOLLENS, employant le naphtorésorcinol chlorhydrique, de nombreux corps interfèrent : glucose, fructose, acide sialique, acides aminés. Cependant, il est possible d'éliminer la perturbation due à l'acide sialique par mesure de l'absorption à 565 m μ . La coloration obtenue est extraite par l'alcool isoamylique.

Nous utilisons la technique de K. U. LEFEVRE et B. TOLLENS (71), modifiée par W. DEICHMANN (17).

Réactifs

1. Solution de Naphtorésorcinol à 10 % dans l'éthanol à 95°.

Après repos de 24 h, on centrifuge pour obtenir une solution claire.

2. Acide chlorhydrique concentré à 19 g pour 100 ml.

3. Acide galacturonique standard : 5 ml = 100 microgrammes.

Mode opératoire

— On verse dans un tube bouché à l'émeri la solution obtenue en dissolvant 10 mg de glycoprotéines dans 5 ml d'eau.

— Dans un deuxième tube, on introduit 5 ml d'eau distillée, et dans un troisième, 5 ml de la solution étalon d'acide galacturonique.

— On ajoute 0,2 ml d'acide chlorhydrique à 19 % aux trois tubes et on porte au bain-marie à 75° pendant 45 mn.

— Après refroidissement, on verse 5 ml d'acide chlorhydrique concentré et 1 ml de naphtorésorcinol, et on place au bain-marie à 50° pendant 90 mn.

— La coloration bleue violacée est extraite par 10 ml d'alcool isoamylique versé dans la solution revenue à la température ambiante : la réaction est stable une heure. On centrifuge.

— La mesure est effectuée en petite cuve à 565 m μ .

CHAPITRE VIII

ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER

Technique générale

On travaille avec l'appareil Elphor H, en utilisant les bandes de papier Schleicher n° 2043 a Mgl (32 × 4 cm).

Les tampons employés sont :

— Tampon pH 8,6, force ionique 0,10 :

Véronal sodique	20,26 g
Acétate de sodium cristallisé	12,95 g
Acide chlorhydrique 0,10 N	120 ml
Eau distillée, q.s.p.	2 000 —

— Tampon pH 4 :

Pyridine	30 ml
Acide acétique.	100 —
Eau distillée, q.s.p.	5 000 ml

Les pH sont contrôlés par référence à l'électrode de verre.

Les liquides à étudier sont analysés par électrophorèse après le fractionnement. Un échantillon du liquide d'origine est conservé à — 20° durant les relargages ; il est amené à température ambiante quand il en est besoin et sert alors à la comparaison des différents groupes.

L'ensemble des bandes nécessaires est immergé dans la solution tampon, placé sur plusieurs épaisseurs de papier filtre et abandonné pendant une dizaine de minutes pour permettre l'élimination de l'excès de tampon. Les bandes sont ensuite tendues sur le chevalet.

Pour déposer le liquide, une micropipette de 10 mm³ est utilisée. On détermine préalablement par la méthode au biuret la quantité de protéines contenue dans les diverses fractions et on calcule le nombre de microlitres qui seront déposés sur les bandes.

Les échantillons sont placés sur la ligne de départ (longueur de 3,5 cm), située à 9 cm de l'une des extrémités du papier. Cependant, pour l'électrophorèse à pH 4, le point de départ se trouve au milieu de la bande.

La durée du développement est de 14 h sous 110 V. Les papiers sont séchés à l'étuve à 37° pendant une heure, puis à l'étuve à 100° pendant 30 mn.

La détermination de la densité optique des frontières électrophorétiques est effectuée directement au moyen du densitomètre électronique Photovolt, modèle 525.

I. — PROTEINOGRAMMES

Séparation

Le liquide étudié, ou les fractions protéiniques, sont déposés en quantité telle que le poids des protéines soit constant à partir d'un volume de base de 10 mm³ pour 50 g de protéines par litre.

Dans le cas des mucoprotéines, il faut doubler le volume, car près de la moitié de ces substances est formée de substances glucidiques non colorées par l'amidoschwarz.

Révélation des bandes

Après séchage à 100°, elles sont colorées par la technique de E. Koiw (33).

Réactifs

1. Réactif colorant :

Amidoschwarz 10 B.	0,50 g
Méthanol	300 ml
Acide acétique	50 —
Eau distillée.....	100 —

2. Liquide de lavage identique au précédent, sauf omission du colorant.

Mode opératoire

— Les bandes sont colorées par immersion dans la solution d'amidoschwarz durant 20 mn.

— La décoloration du fond est obtenue par des bains successifs dans le liquide de lavage (environ 60 mn).

— La cuve, dans laquelle s'effectue le rinçage des papiers, est soumise à un mouvement oscillatoire, type agitateur de Kahn.

— Les densités optiques sont mesurées à 595 m μ .

II. — GLUCIDOGRAMMES

Nous employons la technique de E. KOIW et GRONVALL (32) avec la modification terminale de ROMANI (52).

Après l'oxydation périodique, le bain réducteur préconisé par

différents auteurs a été supprimé, car nous avons remarqué qu'il diminuait l'intensité de la coloration obtenue (constatations déjà citées par GROULADE (29)). Ce bain est remplacé par un simple rinçage à l'alcool sulfité.

Les colorations roses violacées obtenues s'atténuent rapidement. Par action du formol, ROMANI constate une intensité de la couleur et une stabilisation : depuis deux ans, des bandes colorées par cette technique n'ont pas perdu leur intensité.

Un volume, double de celui qui est utilisé pour les protéogrammes, est employé pour les électrophorèses des fractions obtenues, sauf pour la fraction 4, très riche en glucides liés aux protéines : dans ce dernier cas, le volume est de 10 mm³.

Révélation des bandes

Réactifs

1. *Solution oxydante*, préparée extemporanément :

Acide périodique.	1,20 g
Eau distillée.....	30 ml
Acétate de sodium 0,2 M	15 —
Ethanol absolu.	100 —

2. *Solution sulfitée pour rinçage* :

Métabisulfite de potassium.....	4 g
Eau distillée.....	1000 ml
Acide chlorhydrique concentré	10 —

3. *Solution alcoolique sulfitée*.

Au moment de l'utilisation, on additionne le bain alcoolique du quart de son volume de solution sulfitée de rinçage.

4. *Réactif de Schiff*.

Les fuschines basiques GEIGY et GRUBLER ne donnent pas de solutions parfaitement incolores, mais jaunes et rosissant rapidement. Seules, la fuschine basique R.A.L. et la pararosaniline Eastman-Kodak ont permis d'obtenir un réactif incolore et stable.

Après dissolution à chaud de 2 g de chlorhydrate de pararosaniline ou de fuschine basique dans 400 ml d'eau distillée, on laisse refroidir et on ajoute 4 g de métabisulfite de potassium. On rend acide par adjonction de 10 ml d'acide chlorhydrique 2 N et on laisse la solution se décolorer progressivement à l'obscurité pendant 12 h. Pour éliminer les colorations persistantes, il est indispensable de procéder alors à une agitation de la solution en présence de 1 g de noir Norit, suivie d'une filtration sur papier Whatman n° 1. Le filtrat est acidifié à nouveau en ajoutant 30 ml d'acide chlorhydrique 2 N et conservé dans un flacon jaune bouché à l'émeri au frigidaire.

Quand il en est besoin, le réactif de SCHIFF est dilué avec un volume égal d'éthanol à 95°.

Mode opératoire

— Après séchage à 100° pendant 30 mn, les bandes sont immergées dans la solution périodique pendant *5 mn exactement*.

— Elles sont lavées soigneusement dans la solution alcoolique sulfitée (deux à trois lavages de deux minutes sont nécessaires pour éliminer l'acide périodique).

— On les plonge pendant *15 mn exactement* dans le réactif de SCHIFF.

— Après rinçage de 5 mn dans cinq bains successifs d'eau sulfitée, on lave à l'alcool puis à l'acétone, et l'on sèche les bandes à l'air.

— Elles sont alors soumises à l'action du formol pendant 5 mn, puis lavées à l'eau courante, à l'alcool, et enfin à l'acétone. On termine par un séchage à l'air.

— La lecture est faite à 545 m μ .

III. — PROTÉINOGRAMMES ET GLUCIDOGRAMMES

Après l'étude des différentes fractions par rapport au liquide d'origine, une seule bande d'électrophorèse (32 $\times$ 12 cm) est développée. Après séchage, elle est découpée en deux parties. L'une est colorée par l'amidoschwarz, l'autre par le réactif de SCHIFF. Ceci nous permet de déterminer avec précision l'emplacement des glycoprotéines par rapport aux autres protéines.

CHAPITRE IX

DIFFÉRENCIATION ET DÉTERMINATION DES GLUCIDES APRÈS SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Jusqu'à l'apparition de la chromatographie sur papier, l'analyse qualitative et quantitative d'un mélange de glucides était difficile. Introduites par PARTRIDGE (45) sur le plan qualitatif, les premières déterminations quantitatives par ce procédé furent rapportées par FLOOD, HIRST et JONES (23), et fondées sur le dosage de chaque spot élué par la méthode de NELSON-SOMOGYI (41-55).

Toutefois, l'élément essentiel d'un dosage par chromatographie sur papier nous semble être moins la technique de détermination du spot élué que l'élaboration d'un système solvant de haut pouvoir résolutif dans le cadre d'un problème bien défini. Aussi, le but que nous nous proposons est-il la mise au point d'une méthode permettant avec un seul solvant, la séparation très nette des substances glucidiques trouvées dans les glycoprotéines et les mucopolysaccharides après une hydrolyse contrôlée.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Substances de référence

Nous utilisons des solutions aqueuses à 1 %.

La pureté chromatographique de chaque produit a été précisée avec les différents solvants choisis.

a) Acide d.glycuronique.

b) Acides sialiques.

Deux échantillons nous ont été adressés par M. Lars SVENNERHOLM, dont l'un d'acide N.acétylsialique pur, et l'autre formé du mélange des acides N.acétyl- et N.glycolysialiques.

c) Oses. (Produits biochimiques ROCHES.)

1. Méthylpentoses : 1.Fucose, 1.Rhamnose.

2. Hexoses : d.Galactose, d.Glucose, d.Mannose.

d) Osamines.

— Chlorhydrate de d.glucosamine (ROCHE).

— Chlorhydrate de d.galactosamine. Ne trouvant pas de produit pur dans le commerce, nous avons dû préparer celui-ci à partir de l'acide chondroïtine-sulfurique.

PRÉPARATION DE LA GALACTOSAMINE

1. *Extraction de l'acide chondroïtine-sulfurique.*

100 g de cloisons nasales de porc, débarrassées des os et des restes de viande, sont divisées en menus fragments au mixer et mises à macérer dans 250 ml de potasse à 2 %, pendant 24 h à 37°. Après filtration, le résidu est traité de nouveau par 250 ml de potasse à 2 %. Les extraits, acidifiés par l'acide acétique 5 N et additionnés d'un léger excès de carbonate de baryum, sont concentrés au bain-marie jusqu'à 200 ml.

Après repos de 12 h et centrifugation, le liquide surnageant est acidifié de nouveau par l'acide acétique et concentré à 100 ml. Après refroidissement pendant 1 h au frigidaire, l'extrait est centrifugé pour séparer les protéines dénaturées. Le liquide décanté est versé très lentement dans 900 ml d'acide acétique glacial, sous agitation constante, opération au cours de laquelle apparaît un précipité volumineux de chondroïtine-sulfate de potassium. Après un repos de 12 h au frigidaire, le précipité est centrifugé, lavé par 100 ml d'acide acétique glacial et 100 ml d'éthanol absolu. Il est séché sous vide.

2. *Purification de l'acide chondroïtine-sulfurique.*

Celle-ci est nécessaire pour éliminer les protéines résiduelles. Après dissolution du sel de potassium dans 100 ml d'eau distillée, une solution d'acétate basique de plomb à 2 % est versée goutte à goutte jusqu'à précipitation totale des protéines. Le précipité recueilli est lavé trois fois à l'eau distillée, puis mis en suspension dans 250 ml d'une solution acide d'acétate de baryum (1 % d'acide acétique et 2 % de sel de baryum). Le plomb est éliminé sous forme de sulfure par passage d'hydrogène sulfuré. Le précipité est filtré en présence de Célite jusqu'à obtention d'une solution parfaitement limpide et le gaz en excès est chassé par un courant d'air. 500 ml d'éthanol absolu sont ajoutés à la solution de chondroïtine-sulfate

de baryum. Après repos d'une nuit, le précipité est centrifugé, lavé successivement par de l'alcool à 50°, 80° et absolu, puis séché sous vide pendant 48 h.

3. Préparation de la galactosamine.

200 mg de chondroïtine sulfate de baryum sont hydrolysés en présence d'acide chlorhydrique 6 N en tube scellé, pendant 4 h à 100°. Le sulfate de baryum insoluble est éliminé par centrifugation. La solution est évaporée à sec sous courant d'air. Repris plusieurs fois par le méthanol et évaporé, l'extrait est finalement dissous dans 2 ml d'eau distillée et passé sur une résine cationique Dowex 50, forme H⁺, 25 à 50 mesh (colonne ayant 18 mm de diamètre ; hauteur de résine : 20 cm). La résine a été préalablement régénérée par l'acide chlorhydrique normal, puis lavée à l'eau distillée jusqu'à élimination de toutes traces d'acide. Après passage de l'extrait, on lave la colonne par 200 ml d'eau distillée qui sont rejetés. Les osamines sont extraites par 200 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N, en faisant passer 1 ml/mn. On recueille par fraction de 50 ml. On constate la présence d'osamines dans chaque lot par la réaction d'ELSON-MORGAN. Sachant que la glucosamine passe la première (GARDELL : 25) et que l'acide chondroïtine-sulfurique en contient une certaine quantité, seules les fractions passant après 100 ml sont conservées ; elles sont évaporées sous vide. La pureté de cette galactosamine est contrôlée par chromatographie sur papier en comparaison avec un témoin de glucosamine : *un seul spot* fut mis en évidence, ce qui permet d'admettre la pureté du produit.

Papiers

1. Whatman 1 et 3 MM.
2. Schleicher et Schull 2 043 b et 2 045 b, lavés aux acides.

Solvants

Différents solvants acides, alcalins ou neutres, ont été successivement utilisés. Seuls, les solvants monophasiques seront employés afin de réduire les perturbations dues aux variations de température.

a) Solvants acides.

- | | |
|---|---------------------|
| 1. Butanol/acide acétique/eau | 8 : 4 : 3 (15) |
| 2. Butanol/acide chlorhydrique/eau..... | 150 : 4,5 : 30 (40) |

b) Solvants neutres.

- | | |
|---|----------------|
| 3. Alcool isopropylique/butanol/eau | 7 : 1 : 2 (15) |
| 4. Acétone/éthanol/eau | 3 : 3 : 1 (15) |

c) Solvants alcalins pyridiniques.

- | | |
|------------------------------|-----------|
| 5. Butanol/pyridine/eau..... | 7 : 7 : 6 |
| 6. Butanol/pyridine/eau..... | 7 : 7 : 2 |

7. Butanol/pyridine/eau.....	5 : 3 : 2
8. Alcool isoamylique/pyridine/eau.....	7 : 7 : 6 (15)
9. Alcool isoamylique/pyridine/eau.....	7 : 6 : 2 (15)
10. Alcool isoamylique/pyridine/eau.....	4 : 4 : 2
11. Butanol/pyridine/ClH 0,10 N.	5 : 3 : 2
12. Alcool amylique/pyridine/ClH 0,10 N. ...	4 : 4 : 2

RÉVÉLATION DES TACHES

1. Examen aux U.V.

Après chauffage du chromatogramme à 80° pendant 1 h, l'examen en lumière ultra-violette fait apparaître des spots de fluorescence bleue au niveau des osamines.

Cette révélation est sensibilisée si l'on pulvérise au préalable du carbonate de sodium M sur le papier.

2. Solution acétonique de ninhydrine à 1 %.

3. Réactif à l'oxalate d'aniline (PARTRIDGE : 45).

Solution aqueuse d'acide oxalique à 2,5 %	3 volumes
Solution alcoolique d'aniline à 2 %	2 —

Après pulvérisation du réactif sur le papier, celui-ci est mis à l'étuve à 100° pendant 10 mn. Les aldoses et les acides uroniques donnent des taches brun-rouge, les méthylpentoses, des taches jaune-brun et les pentoses, des spots rouges.

4. Réactif à l'urée chlorhydrique (DEDONDER : 16).

Urée	20 g
Acide chlorhydrique concentré	15 ml
Ethanol	400 —

Après chauffage à l'étuve à 100°, pendant 5 mn, les cétooses donnent des taches vert-noirâtre. Ce réactif augmente l'intensité des spots des aldoses révélés par le réactif de PARTRIDGE.

5. Réactif d'Elson et Morgan (Procédé de PARTRIDGE modifié).

Il est spécifique des osamines.

a) Pulvérisation de la solution extemporanée suivante :

Acétylacétone Merck.	1,5 ml
Carbonate de sodium 1,25 N	50 —

Séjour à l'étuve à 95°, pendant 15 mn.

b) Pulvérisation du réactif d'EHRlich modifié :

p. diméthylaminobenzaldhyde	1 g
Ethanol	30 ml
Acide chlorhydrique concentré	30 —
n. Butanol	180 —

Après un séjour à l'étuve à 90°, pendant 5 mn, les osamines donnent une coloration rose-violette.

6. Révélation des acides sialiques.

a) Réactif d'Ehrlich modifié par Svennerholm (57).

p. diméthylaminobenzaldhyde	0,50 g
Acide trichloracétique.	5 —
Ethanol-eau (à parties égales)	20 ml
n. Butanol	60 —

Après séjour à 100°, pendant 10 mn, les spots sont rouge-violet sur un fond jaune.

b) Réactif de Klevstrand et Nordal (30).

Orcinol.	0,5 g
Acide trichloracétique	15 —
Eau saturée de butanol.	100 ml

Après chauffage à 100°, pendant 5 mn, il y a apparition de taches rouge violacé.

c) Réactif de Svennerholm (57).

Résorcinol	1 g
Acide trichloracétique.	15 —
Ethanol-eau (à parties égales)	20 ml
Sulfate de cuivre 0,1 M.	0,2 —
n. Butanol	60 —

Après chauffage à 100°, pendant 10 mn, les acides sialiques apparaissent en brun violacé sur fond rose.

Enceinte chromatographique.

Elle est constituée par une cuve cylindrique Pyrex de grandes dimensions (hauteur 60 cm, diamètre 30 cm), elle-même fermée par une plaque de verre épais de forme cylindrique et percée d'un trou en son centre. Le solvant est placé à la partie supérieure dans un auget en verre. Un récipient, placé à la partie inférieure, reçoit une partie du mélange saturateur.

La cuve est laissée dans le laboratoire, à la température ambiante, qui oscille entre 20 et 23°.

Il est rigoureusement indispensable d'obtenir une bonne saturation de l'enceinte avec le même mélange que celui qui est utilisé pour le développement des chromatogrammes, ce qui exige au moins 48 h.

Mode opératoire

1. Dimensions du papier.

Nos papiers sont coupés en rectangle de 50 cm de long sur 15 cm de large. A 9 cm de l'un des petits côtés, est tracée au crayon une ligne dite de départ. Les emplacements sur lesquels seront déposés les échantillons sont indiqués au crayon, les deux extrêmes à 2,5 cm des bords de la feuille, les deux intermédiaires séparés les uns des autres de 2 cm. On dispose ainsi de quatre emplacements de 1 cm de long.

2. Détermination qualitative.

A l'aide d'une micropipette, on dépose sur la ligne dite de départ un volume mesuré du mélange de glucides à étudier, placé sur les deux emplacements intérieurs. Sur les deux bandes extérieures on dépose un peu de solutions témoins, contenant l'une, les différents oses et l'autre, le mélange des deux osamines.

Après développement dans le solvant choisi, pendant 16 à 21 h, les papiers sont séchés, d'abord à la température ordinaire pendant 2 h, puis dans une étuve à 80° pendant 1 h. Le papier est divisé en deux bandes, chacune correspondant à deux emplacements : l'une est révélée par l'oxalate d'aniline et l'autre par le réactif d'ELSON et MORGAN.

Par ce procédé, il est possible de mettre en évidence sur un seul chromatogramme les oses et les osamines contenus dans un mélange de glucides après hydrolyse des mucoprotéines.

3. Détermination quantitative.

A l'aide d'une micropipette, étalonnée et contrôlée par nous par pesée de mercure, on dépose sur les deux bandes intérieures 10 microlitres de la solution de glucides, et sur les deux bandes latérales, 5 microlitres de la même solution. Après développement et séchage, les deux emplacements latéraux sont révélés, l'un, par le réactif de PARTRIDGE, l'autre, par le réactif d'ELSON et MORGAN. Au niveau de chaque spot ainsi défini, on découpe sur les deux bandes centrales les carrés de papier correspondant aux substances mises en évidence. Chaque tache est éluée, en plaçant le carré de papier dans un tube à essai contenant 3 ml d'eau bidistillée. Après une nuit au frigidaire à + 4°, 2 ml de chaque éluat sont prélevés pour faire le dosage, soit par la technique de NELSON-SOMOGYI pour les oses, soit par la technique d'ELSON et MORGAN pour les osamines.

Les résultats sont obtenus par rapport à une solution étalon de chaque substance glucidique. Ils exprimeront la moyenne de quatre déterminations, deux chromatogrammes étant développés simultanément.

RÉSULTATS

Nous étudierons successivement :

- l'influence des solvants et des différents papiers sur la séparation des substances glucidiques ;
- les révélations des dites substances ;
- et les essais quantitatifs avec le solvant et le papier choisis d'après les résultats obtenus.

Solvants

Les premières tentatives sont effectuées avec le papier Whatman n° 1, pendant 24 h.

1. *Solvants acides.*

Ils permettent une bonne séparation des oses neutres, sauf entre le galactose et le glucose. Au contraire, la séparation des osamines est impossible, car les R_f sont trop rapprochés (0,01 de différence). De plus, la glucosamine nous a donné fréquemment soit des traînées, soit deux spots de R_f très distincts ; parfois, sur un même chromatogramme, nous avons trouvé côte à côte ces deux accidents.

En remplaçant l'acide acétique par l'acide chlorhydrique, il fut impossible d'obtenir des spots distincts ou d'éliminer les traînées dues aux osamines.

2. *Solvants neutres.*

Ils ont un très mauvais pouvoir séparateur et entraînent un allongement des spots.

3. *Solvants alcalins pyridiniques.*

Tous les mélanges à base de pyridine donnent une excellente séparation des sucres et des deux osamines après 24 h. Cependant, plus la quantité d'eau contenue dans le solvant est importante, plus les taches des sucres aminés s'allongent. En conséquence, l'accroissement de la vitesse de migration des substances par augmentation de la quantité d'eau amène un étirement des spots des osamines.

Ainsi, seuls les solvants pyridiniques, non saturés par l'eau, répondent à l'un des critères que nous nous étions proposés, c'est-à-dire la séparation parfaite des substances glucidiques pouvant exister dans une molécule de glycoprotéines.

Toutefois, lors des essais quantitatifs, il a été constaté que la récupération, totale pour les oses, était partielle pour les osamines. Tenant compte des travaux de MASAMUNE (38), nous avons ajouté aux solvants pyridiniques une certaine quantité d'acide chlorhydrique ; mais le procédé utilisé par cet auteur présente l'inconvénient d'avoir à neutraliser les mélanges, en présence d'un indicateur externe, par une solution d'acide chlorhydrique 2 N jusqu'à pH 5,5 à 6. Aussi, nous avons simplifié en remplaçant les 20 volumes d'eau des systèmes solvants par 20 volumes d'acide chlorhydrique 0,10 N : les résultats obtenus furent identiques à ceux donnés par le solvant de MASAMUNE.

Toutes les recherches ultérieures ont été effectuées en choisissant le mélange Butanol/pyridine/acide chlorhydrique 0,10 N (5 : 3 : 2) préparé de la façon suivante : à 50 ml de butanol, on ajoute 30 ml de pyridine et 20 ml d'acide chlorhydrique 0,10 N ; on ajuste à 100 ml par de l'eau distillée.

Papiers

Les papiers Whatman 3 MM et Schleicher 2045 b lavé aux acides ne permettent pas une résolution suffisante des substances en 24 h car ils sont trop lents. Le Whatman n° 1 réalise une sépa-

ration correcte après 24 h, mais les meilleurs résultats sont obtenus avec le papier Schleicher 2 043 *b* lavé aux acides.

De même, une excellente résolution des substances glucidiques a été obtenue avec le système solvant Alcool iso-amyle/pyridine/acide chlorhydrique 0,10 N (4 : 4 : 2).

En résumé, avec les deux solvants envisagés, utilisant le papier Schleicher 2 043 *b* lavé aux acides, à une température de 20 à 23°, après un développement de 16 heures, il est possible de séparer les glucides existants dans une molécule de mucoprotéines (pl. I et II). Les différentes taches sont bien individualisées, compactes et faciles à découper pour faire les éluions et les dosages. Cependant, il ne faut pas laisser le solvant s'écouler trop longtemps à la partie inférieure du chromatogramme, car les spots d'osamines ont tendance à s'allonger. Il est même possible de retirer le papier lorsque le liquide de résolution atteint le bas de la feuille.

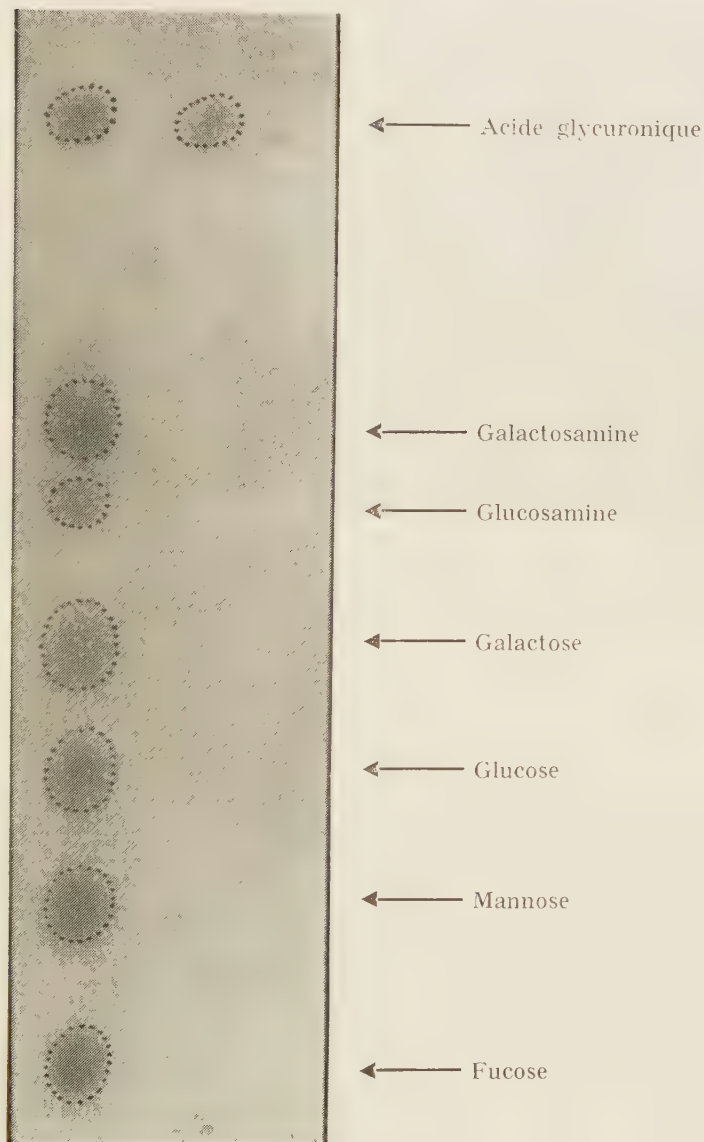
Révélation des taches

Le réactif à la ninhydrine a été abandonné, car il révèle non seulement les oses aminés, mais aussi les acides aminés ou les polypeptides qui subsistent dans l'hydrolysât des mucoprotéines. De même, l'examen à la lumière ultra-violette, après sensibilisation par pulvérisation de carbonate de sodium M, met en évidence les sucres neutres et aminés et les acides uroniques : cependant, les déterminations sont beaucoup plus sensibles pour les osamines.

Seuls, le réactif général de PARTRIDGE et les réactifs spécifiques sont utilisés pour la révélation des différentes substances glucidiques (Tableau I).

PLANCHE I

Séparation d'un mélange d'oses neutres et aminés



Papier Schleicher 2 043 *b* lavé aux acides.

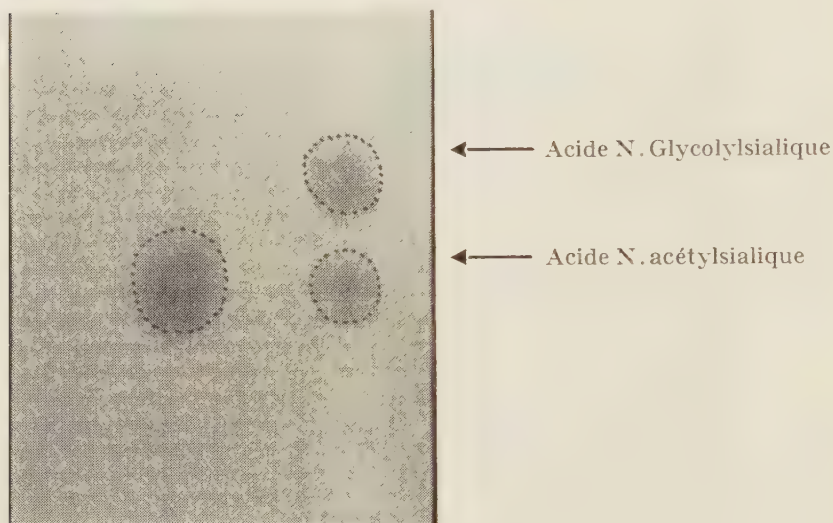
Solvant : Butanol/pyridine/acide chlorhydrique 0,10 N (5 : 3 : 2).

Développement : 24 h.

Révélation : oxalate d'aniline.

PLANCHE II

Séparation d'un mélange de deux acides sialiques



Papier Schleicher 2 043 *b* lavé aux acides.
Solvant : Butanol/pyridine/acide chlorhydrique 0,10 N (5 : 3 : 2).
Développement : 24 h.
Révélation : Orcinol trichloracétique.

TABLEAU 1

Révélation des diverses substances glucidiques

Reactifs	Aldo- hexoses	Ucto- hexoses	Methyl- pentoses	Osamines	Acides uroniques	Acides sialiques
U.V.....	0	0	0	+	0	0
CO ³ Na ² + U.V.	+	+	+	+	+	0
Ninhydrine .	0	0	0	+	0	+
PARTRIDGE .	+	±	+	+	+	0
DEDONDER ..	0	+	0	0	0	0
ELSON - MOR-						
GAN	0	0	0	±	0	0
KLEVSTRAND-						
NORDAL...	0	0	0	0	0	+

+ = Réaction positive.
0 = Réaction négative.

Détermination des Rf

Ils sont donnés par rapport au fucose et au rhamnose, car ces deux sucres migrent le plus rapidement et se trouvent de façon constante dans les glycoprotéines ou les mucopolysaccharides.

On constate que la différence entre les Rf est suffisamment importante pour permettre la séparation nette des diverses substances glucidiques (tableau II).

TABEAU 2

*Rf, calculés après un développement de 24 h
sur papier Schleicher 2043 b lavé aux acides
dans le solvant Butanol/pyridine/ClH 0,10 N (5 : 3 : 2).*

SUBSTANCES GLUCIDIQUES	Rf Rhamnose	Rf Fucose
Acide glycuronique	0,134	0,16
Acide N.glycolylsialique	0,14	0,17
Acide N.acétylsialique	0,20	0,24
Galactosamine	0,36	0,43
Glucosamine	0,42	0,51
Galactose	0,535	0,65
Glucose	0,62	0,76
Mannose.....	0,71	0,85
Fucose	0,82	1
Rhamnose	1	1,21

Essais quantitatifs

Avant d'appliquer la technique chromatographique à l'hydrolysat de la copule glucidique des glycoprotéines, des essais furent effectués à partir d'une solution étalon contenant dans 10 micro-litres 50 microgrammes de chacun des oses suivants :

- Fucose ;
- Mannose ;
- Galactose ;
- et Glucosamine.

Chaque spot sera élué et dosé comparativement à la solution étalon de l'ose, ainsi séparé.

1. *Solvant Butanol/pyridine/eau (5:3:2).*

Les résultats résumés dans le tableau 3 montrent que ce solvant, excellent pour la séparation, se révèle médiocre pour la détermination des osamines dont la récupération est défectueuse.

TABLEAU 3

*Pourcentage de récupération des oses
par rapport à la quantité déposée sur le chromatogramme
(Chaque spot correspond théoriquement à 50 microgrammes)*

Substances	Dosages					Pourcentage de récupération
	1	2	3	4	Moyenne	
Glucosamine .	44,3	43,0	43,0	42,0	43,1	86,2
Glucosamine .	42,0	40,3	40,7	40,7	40,9	81,8
Galactose ..	46,6	44,8	52,7	49,1	48,8	96,6
Mannose	47,9	49,2	50,0	46,8	48,5	97,0
Fucose	49,6	45,5	47,5	47,5	47,5	95,0

La pyridine, présente dans le mélange séparateur, provoque probablement, soit une destruction partielle des sucres aminés, soit une épimérisation des osamines. Toutefois, il semble que la perte soit due à une destruction, car il fut impossible par chromatographie sur papier de mettre en évidence deux spots à partir de la glucosamine, ce sucre aminé donnant par épimérisation de la mannosamine.

2. *Butanol/pyridine/acide chlorhydrique 0,10 N (5:3:2).*

Les résultats, réunis dans les tableaux 4 et 5, montrent que ce solvant permet la récupération des oses et des osamines d'un même mélange avec un rendement de 95 à 100 %.

TABLEAU 4

*Pourcentage de récupération des oses
par rapport à la quantité déposée sur le chromatogramme
(Chaque spot correspond théoriquement à 50 microgrammes)*

Substances	Dosages					Pourcentage de récupération
	1	2	3	4	Moyenne	
Glucosamine .	49,0	52,7	53,3	—	51,7	103,4
Galactose ..	49,3	50,2	48,2	51,1	49,7	99,4
Mannose	49,0	51,0	49,2	47,3	49,1	98,2
Fucose	48,6	48,4	46,9	46,9	47,7	95,4

TABLEAU 5

*Pourcentage de récupération de la glucosamine
et de la galactosamine après chromatographie de leur mélange
(Chaque spot correspond théoriquement à 50 microgrammes)*

Substances	Dosages					Pourcentage de récupération
	1	2	3	4	Moyenne	
Galactosamine	46,2	50,0	48,5	48,2	48,2	96,4
Glucosamine .	48,4	50,6	49,7	49,7	49,6	99,2

En résumé, avec ce solvant mis au point, et utilisant le papier Schleicher 2013 *b* lavé aux acides, nous pouvons séparer et doser les différentes substances glucidiques pouvant exister dans les hydrolysats des glycoprotéines.

Avant d'en déterminer avec cet exposé, il importe de noter ici que nous avons réussi à adapter la technique chromatographique, de telle manière qu'elle réponde aux deux impératifs qui nous étaient imposés pour la suite de cette étude :

- la séparation nette des osamines et des sucres neutres, qui fut obtenue en employant les solvants monophasiques à base de pyridine. Il semble que la résolution des osamines dépend plus de la pyridine et de la quantité d'eau du mélange que de l'alcool employé puisque les mêmes résultats sont obtenus avec le butanol normal ou l'alcool isoamylique.
- la récupération quantitative des osamines, déterminée par comparaison avec des étalons non soumis à la chromatographie, et liée à l'addition d'une certaine quantité d'acide chlorhydrique au mélange.

DEUXIÈME PARTIE

FRACTIONNEMENTS DES LIQUIDES D'EXSUDATS

De nombreux procédés ont été décrits pour la séparation des protéines des liquides biologiques.

Les principales méthodes peuvent se répartir en deux grands groupes :

- Fractionnement par les solvants organiques (14-53-2) ;
- Séparation par augmentation de la force ionique, c'est-à-dire relargage par des sels neutres.

Toutes les techniques dépendent étroitement de plusieurs paramètres et parmi ceux-ci les plus importants sont le pH, la température et la force ionique. Dans le procédé de COHN (14), dont l'emploi s'est généralisé, tous les facteurs varient en même temps, mais le plus exigeant de ceux-ci est la température. En effet, pour éviter une dénaturation possible des protéines, il convient de travailler dans une chambre froide et avec une centrifugeuse réfrigérée. Lors de nos premières investigations, nous avons volontairement abandonné les procédés à base de solvants organiques, en particulier celui à base d'alcool, pour employer ce dernier uniquement lors de la purification des groupes protidiques.

La précipitation par les sels neutres dépend du pH, de la température et des ions. En fixant les deux premiers facteurs, il nous est donc possible de fractionner les liquides biologiques en choisissant le sulfate d'ammonium, qui s'est révélé le meilleur agent de relargage et est employé de façon générale par la plupart des auteurs.

A côté de ces techniques très générales, de nombreux procédés ont été décrits pour extraire un groupe (gamma globulines) ou une substance particulière, telle que l'orosomucoïde de WINZLER (62).

Aussi, pour résoudre le problème que nous avons posé, nous rechercherons la ou les fractions protéiniques contenant une muco-

protéine, puis, après avoir précisé les conditions d'isolement de celle-ci, nous établirons une technique de préparation définitive de cette glyco-protéine.

En conséquence, pour réaliser ce travail, nous étudierons successivement :

- l'électrophorèse des liquides pleuraux totaux ;
 - le relargage au sulfate d'ammonium ;
 - la purification alcoolique du groupe protidique, présentant le rapport Hexoses/Protides le plus élevé ;
 - les fractionnements perchlorique et sulfosalicylique.
-

CHAPITRE PREMIER

LIQUIDES PLEURAUX TOTAUX

Les liquides d'exsudats, présentant une réaction de Rivalta très positive, provenaient tous de malades atteints de pleurésie sérofibrineuse et tuberculeuse. Nous éliminons tous les liquides d'une autre origine (cancer et œdème cardiaque), et les exsudats purulents ou contenant une forte quantité de sang afin d'éviter l'apport de mucoprotéines d'origine sérique ou dues à la destruction cellulaire.

Matériel

Les liquides étudiés présentaient les caractères suivants :

N^o 1.

Nombreux polynucléaires plus ou moins altérés.

Petit nombre de lymphocytes.

Absence de sang.

Présence de bacilles de Koch à l'examen direct et après culture.

N^{os} 2, 3 et 4.

Nombreux lymphocytes.

Petit nombre de polynucléaires altérés.

Assez grand nombre de cellules endothéliales.

Présence de bacilles de Koch après culture.

N^{os} 5 et 6.

Polynucléaires et lymphocytes à parties égales.

Nombreuses cellules endothéliales.

Absence de globules rouges.

Présence de bacilles de Koch après culture.

N^o 7.

Nombreux polynucléaires et lymphocytes.

Présence de globules rouges.

Présence de petits diplocoques lancéolés à Gram + type pneumocoques.

Présence de bacilles de Koch à l'examen direct.

N° 8.

Nombreux lymphocytes.

Petit nombre de polynucléaires et cellules endothéliales.

Absence de globules rouges.

Présence de bacilles de Koch après culture.

N° 9.

Nombreux lymphocytes et polynucléaires.

Présence de bacilles de Koch à l'examen direct.

Le liquide pleural, chyleux, provient d'un pneumothorax ancien : après avoir été soigné en 1938-39 d'une pleurésie, le malade n'avait pas eu d'accidents tuberculeux jusqu'en 1956, date à laquelle il fut hospitalisé pour un épanchement pleural bilatéral.

N° 10.

Très nombreux lymphocytes.

Rares polynucléaires.

Petit nombre de cellules endothéliales.

Absence de bacilles de Koch à l'examen direct et après culture.

Le malade présentait cependant une atteinte tuberculeuse au niveau supérieur du poumon droit avec présence de bacilles de Koch dans les crachats.

Résultats

Après addition de thrombase (10 mg/l), les liquides sont mis à l'étuve à 37° pendant une heure et centrifugés pour éliminer la fibrine. Ils sont placés 24 h à + 4° et une nouvelle centrifugation est effectuée.

Sur chaque liquide, nous déterminons les rapports entre les hexoses et les protéines et nous faisons une électrophorèse à pH 8,6 et pH 4.

A) Rapport entre les hexoses et les protéines.

Le tableau 6 résume les dosages des protéines totales et des glucides, déterminés sur les dix liquides pleuraux.

On constate que les rapports hexoses protéines sont en général supérieur à 2, ce qui les différencie des sérums normaux dont la moyenne est de 1,66. Cette augmentation des glucides liés aux protéines se retrouve d'ailleurs dans tous les liquides pathologiques, en particulier le sérum des tuberculeux et des cancéreux, et dans le liquide synovial après un rhumatisme articulaire.

TABLEAU 6

*Pourcentage des hexoses (galactose — mannose)
par rapport aux protéines totales*

Liquides pleuraux exsudatifs	Protéines totales (g l)	Hexoses en mg l	Pourcentage H P
1	43,68	908	2,08
2	41,6	880	2,11
3	41,6	846	2,03
4	39,9	802	2,01
5	46,6	1 022	2,19
6	62,47	1 274	2,04
7	47,7	975	2,05
8	50,5	950	1,88
9	47,5	1 028	2,16
10	62,5	1 226	1,96
Sérums	70,8	1 180	1,66

— Les protéines ont été déterminées par la méthode du biuret.

— Les chiffres donnés pour les sérums représentent la moyenne des dosages faits sur dix sérums normaux.

B) Électrophorèses.

Par migration électrophorétique à pH 8,6, et coloration à l'amidoschwarz (planche n° 3), on constate l'augmentation des alpha 2 globulines.

La mesure des courbes au densitomètre photovolt nous permet de déterminer les proportions des différentes fractions protéiques entre elles (tableau 7).

TABLEAU 7

Proportions des différentes protéines
Diagramme électrophorétique effectué au densitomètre Photovolt
à 595 mμ
Planimétrie des courbes

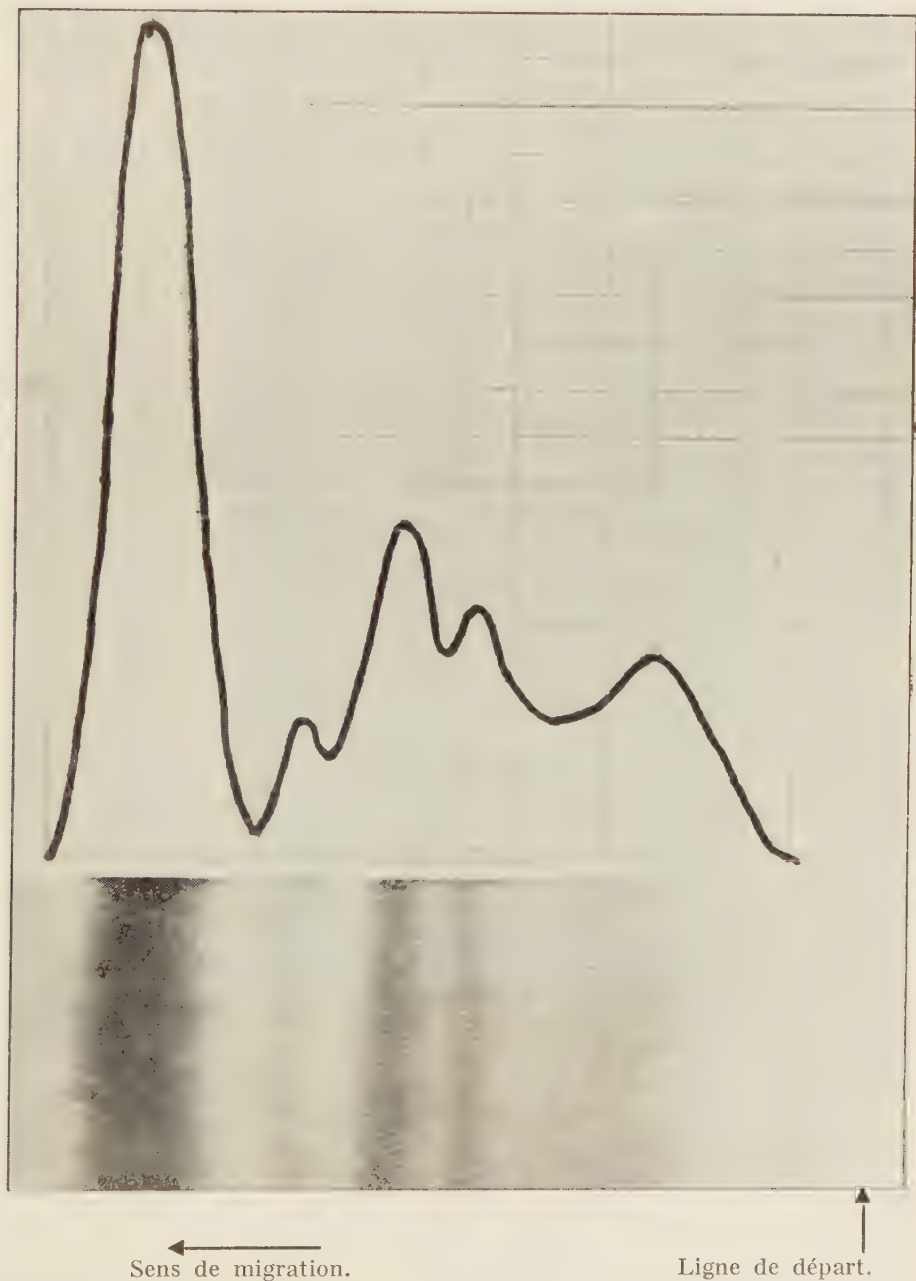
Exsudats	Albumine	Globulines				Rapport A/G
		Alpha 1	Alpha 2	Béta	Gamma	
1	61,0	4,4	13,3	5,0	15,3	1,56
2	49,2	5,9	10,7	10,0	24,2	0,95
3	55,0	6,2	7,5	7,4	23,9	1,22
4	55,9	7,2	14,4	11,3	11,2	1,27
5	53,5	7,3	12,1	9,0	18,1	1,15
6	59,1	4,0	12,4	6,5	18,0	1,44
7	48,1	7,0	13,3	9,7	21,9	0,92
8	50,8	4,0	18,5	10,1	16,6	1,03
9	59,0	7,7	17,7	7,7	7,9	1,44
10	49,9	3,6	13,9	12,8	19,8	0,99
Sérums	58,9	3,6	7,9	12,3	17,3	1,43

PLANCHE N° 3

Electrophorèse à pH 8,6

Coloration à l'amidoschwarz.

Mesure au densitomètre Photovolt (à 595 m μ).



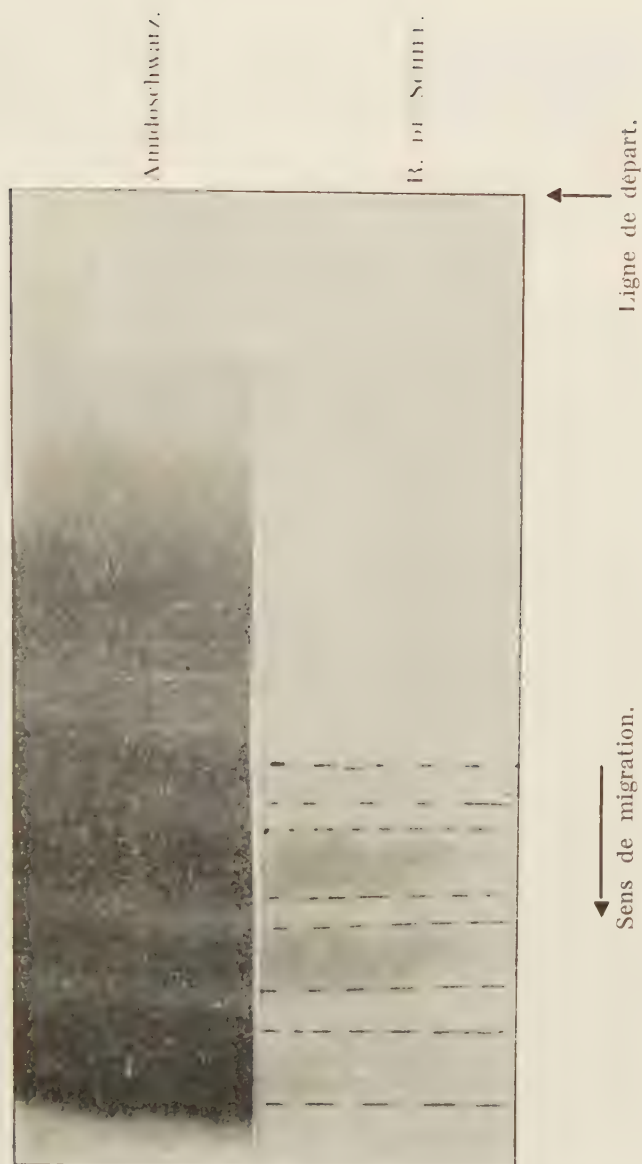
Tous les liquides d'exsudats pleuraux présentent une forte augmentation des alpha 2 globulines, une faible élévation des alpha 1 globulines, une diminution parfois importante des bêta globulines et des proportions normales ou faiblement augmentées des gamma globulines. Les rapports entre le albumines et les globulines varient de 0,92 à 1,56. L'élévation du groupe des alpha-globulines coïncide vraisemblablement avec le rapport élevé des hexoses liés aux protéines, ce qui est le caractère général de tous les syndromes inflammatoires.

Après coloration par le réactif de SCHIFF, toutes les fractions protéiques donnent une réaction positive, exceptée la bande des gamma globulines (Planche n° 4).

PLANCHE N° 4

Electrophorèse à pH 8,6

Coloration par le réactif de Sumi, après oxydation périodique.

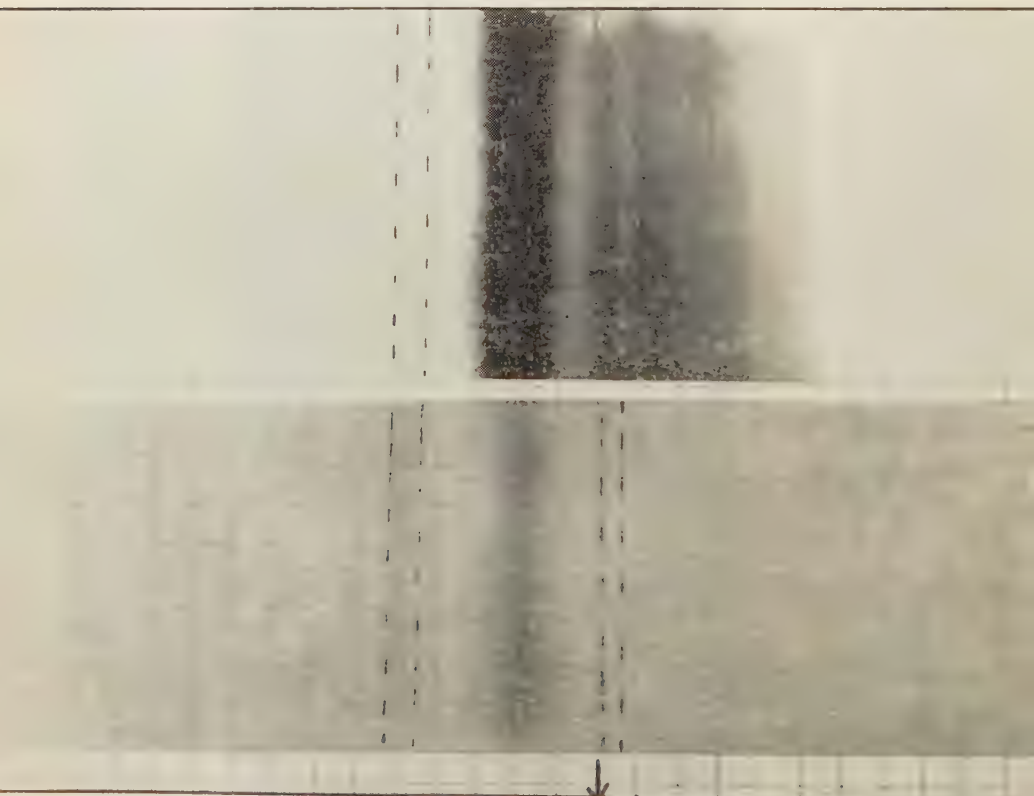


Par électrophorèse à pH 4, les liquides pleuraux présentant toujours une fraction protéique migrant à l'anode et fortement colorée par le réactif de SCHIFF. La bande centrale, formée des albumines et de la majeure partie des alpha globulines, est elle-même très intensément P. A. SCHIFF positive (Planche n° 5).

PLANCHE N° 5

Electrophorèse à pH 4

La bande supérieure est révélée par le réactif à l'amidoschwarz et l'inférieure par le réactif de SCHIFF après oxydation périodique.



Anode.

Ligne de départ.

Cathode.

CHAPITRE II

RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

Afin de préciser dans quelles fractions protéiques se trouvent les mucoprotéines, le fractionnement des liquides pleuraux a été réalisé au moyen d'une solution de sulfate d'ammonium Merck (pur pour analyse), de molarité 4 M et amenée à pH 7 par une solution d'ammoniaque au 1/20. Seule, la dernière fraction a été obtenue par saturation avec le sel cristallisé. Ainsi, nous divisons chaque liquide d'exsudat pleural en quatre groupes correspondant aux concentrations en sulfate de 33 %, 55 %, 70 % et 100 %, la solution de molarité 4 M étant théoriquement égale à 100 %.

Préparation des différentes fractions protéiques

A un litre d'exsudat, débarrassé de la fibrine et amené à pH 7, on ajoute en agitant lentement et goutte à goutte une quantité connue de sulfate d'ammonium 4 M jusqu'à la concentration de 33 % (1). On laisse le précipité se déposer une nuit à la température ambiante. Après centrifugation, le culot est lavé par une solution de sulfate correspondant à la concentration de la fraction obtenue et le liquide de lavage est ajouté au centrifugat.

En opérant de la même façon, on obtient successivement les protéines précipitées aux concentrations de 55 et 70 %.

Finalement, le liquide surnageant est saturé par des cristaux de sulfate d'ammonium et le précipité est lavé par la solution 4 M.

Les culots de centrifugation, mis en suspension dans le sérum physiologique, sont dialysés contre l'eau courante jusqu'à dispari-

(1) La quantité de solution de sulfate d'ammonium 4 M se détermine facilement par application de la formule suivante :

$$y = \frac{V (S_2 - S_1)}{100 - S_2}$$

S_1 = concentration de départ ;

S_2 = concentration à obtenir ;

V = volume de la solution ayant la concentration S_1 .

tion totale du sulfate d'ammonium (contrôle au réactif de NESSLER), puis contre l'eau distillée pendant 24 h à la glacière. A chaque dialysat, une quantité de chlorure de sodium, correspondant à 9 g/l, est ajoutée, ce qui est indispensable pour assurer la dissolution des euglobulines, surtout dans les premières fractions.

On contrôle le fractionnement en faisant sur chaque groupe isolé le dosage en double des protéines, des hexoses, et les électrophorèses à pH 8,6 et pH 4.

Résultats

A) *Rapports entre les hexoses et les protéines des fractions séparées.*

Par relargage au sulfate d'ammonium, effectué sur six liquides d'exsudats pleuraux, quatre fractions protéiniques sont obtenues, correspondant aux concentrations en sulfate de 33, 55, 70 et 100 % (tableaux 8, 9, 10, 11, 12 et 13).

TABLEAU N° 8

*Fractionnement du liquide n° 1 par le sulfate d'ammonium à différentes concentrations (sur un litre).
Dosage des protéines par la méthode du biuret*

Groupes	Concentrations en sulfate	Protéines (en g)	Hexoses (en mg)	Rapport H/P
1	0- 33 %	14,28	174,0	1,21
2	33- 55 %	5,50	227,0	4,13
3	55- 70 %	18,82	273,0	1,45
4	70-100 %	2,40	127,0	5,29

TABLEAU N° 9

*Fractionnement de un litre de liquide n° 2 par le sulfate d'ammonium à différentes concentrations.
Dosage des protéines par la méthode au biuret*

Groupes	Concentrations en sulfate	Protéines (en g)	Hexoses (en mg)	Rapport H/P
1	0- 33 %	12,20	250,0	2,05
2	33- 55 %	4,30	147,0	3,46
3	55- 70 %	20,00	267,0	1,33
4	70-100 %	1,80	126,0	7,00

TABLEAU N° 10

*Fractionnement de un litre de liquide pleural n° 3
par le sulfate d'ammonium à différentes concentrations.
Dosage des protéines par la méthode du biuret*

Groupes	Concentrations en sulfate	Protéines (en g)	Hexoses (en mg)	Rapport H/P
1	0- 33 %	13,80	194,5	1,41
2	33- 55 %	7,32	176,0	2,40
3	55- 70 %	17,00	267,0	1,57
4	70-100 %	2,29	147,0	6,41

TABLEAU N° 11

*Fractionnement de un litre de liquide pleural n° 4
par le sulfate d'ammonium à différentes concentrations.
Dosage des protéines par la méthode du biuret*

Groupes	Concentrations en sulfate	Protéines (en g)	Hexoses (en mg)	Rapport H/P
1	0- 33 %	9,60	148,0	1,54
2	33- 55 %	6,90	255,0	3,70
3	55- 70 %	20,25	255,0	1,26
4	70-100 %	0,80 (1)	83,0	10,37

(1) Dosage par la méthode de Lowry.

TABLEAU N° 12

*Fractionnement de un litre de liquide pleural n° 5
par le sulfate d'ammonium à différentes concentrations.
Dosage des protéines par la méthode du biuret*

Groupes	Concentrations en sulfate	Protéines (en g)	Hexoses (en mg)	Rapport H/P
1	0- 33 %	12,40	216,8	1,75
2	33- 55 %	8,88	341,0	3,84
3	55- 70 %	22,20	333,0	1,50
4	70-100 %	0,56 (1)	60,4	10,78

(1) Dosage par la méthode de Lowry.

TABLEAU N° 13

*Fractionnement de un litre de liquide pleural n° 6
par le sulfate d'ammonium à différentes concentrations
Dosage des protéines par la méthode au biuret*

Groupes	Concentrations en sulfate	Protéines (en g)	Hexoses (en mg)	Rapport H/P
1	0- 33 %	18,0	242,5	1,35
2	33- 55 %	10,40	370,0	3,56
3 (1)	55- 70 %	23,34	261,0	1,12
4	70-100 %	1,52	178,6	11,75

(1) Il y a eu perte d'une partie du groupe 3 lors de la dialyse.

En conclusion, si on réunit dans un même tableau les résultats obtenus en déterminant le pourcentage des protéines par rapport aux protides totaux et le pourcentage des hexoses par rapport aux glucides totaux (tableau 14), on constate :

- La faible concentration en protéine du groupe 4 ;
- La grande richesse en hexoses liés aux protéines de cette même fraction et la richesse relative du groupe 2 ;
- Le pourcentage faible en glucides des fractions 1 et 3.

TABLEAU N° 14

*Pourcentage des protides et des hexoses dans les fractions
séparées par relargage au sulfate d'ammonium*

Groupes	Concentrations en sulfate	Pourcentage des protides	Pourcentage des hexoses	Rapport H/P
1	0- 33 %	24,6 à 33,17	18,45 à 28,41	1,21 à 2,05
2	33- 55 %	10,34 à 19,05	16,70 à 33,45	2,40 à 4,13
3	55- 70 %	37,34 à 50,60	20,49 à 32,64	1,12 à 1,57
4	70-100 %	1,20 à 5,50	5,91 à 17,37	5,29 à 11,75

Les résultats donnés représentent les chiffres extrêmes des fractions après relargage sur six liquides d'exsudats pleuraux.

B) *Électrophorèses.*

Chaque fraction, révélée par l'amidoschwarz, présente plusieurs bandes avec prédominance de l'une d'entre elles, qui est différente suivant le groupe isolé :

- Gamma globulines dans la première fraction (planche 6) ;
- Alpha 2 globulines dans la deuxième fraction (planche 7) ;
- Albumines dans la troisième fraction (planche 8) ;
- Albumines et surtout alpha I globulines dans le dernier groupe (planches 9 et 9 *bis*).

Si, dans les trois premiers groupes, les glucidogrammes donnent une intensité des bandes semblable à celle donnée par les protéinogrammes, le dernier groupe présente au contraire une forte coloration des alpha I globulines alors que c'est l'albumine qui est le plus intensément colorée par l'amidoschwarz. Cette particularité de la dernière fraction se retrouve si l'on effectue l'électrophorèse à pH 4 : l'albumine se déplace vers la cathode, mais une bande fortement révélée par le réactif de SCHIFF migre vers l'anode (planche 10).

Le dernier groupe, s'opposant aux trois premiers par les caractères suivants : grande solubilité dans le sulfate d'ammonium, migration vers l'anode à pH 4 de l'un des constituants, révélation intense par le réactif de SCHIFF après oxydation périodique, présente seul les caractères des mucoprotéines.

PLANCHE N° 6

*Électrophorèse à pH 8,6 du groupe n° 1
obtenu par relargage au sulfate d'ammonium à la concentration de 33 %*

La bande supérieure correspond au liquide d'origine.

Révélation des bandes supérieures, et médiane à l'amidoschwarz.

Révélation de la bande inférieure au réactif de Schrey.



→ Sens de migration.

← Ligne de départ.

PLANCHE N° 7

*Electrophorèse à pH 8,6 du groupe n° 2
obtenu par relargage au sulfate d'ammonium
à la concentration de 33 à 55 %*

La bande supérieure correspond au liquide non fractionné.
Révélation des bandes supérieure et médiane à l'amidoschwarz.
Révélation de la bande inférieure par le réactif de SCHIFF.



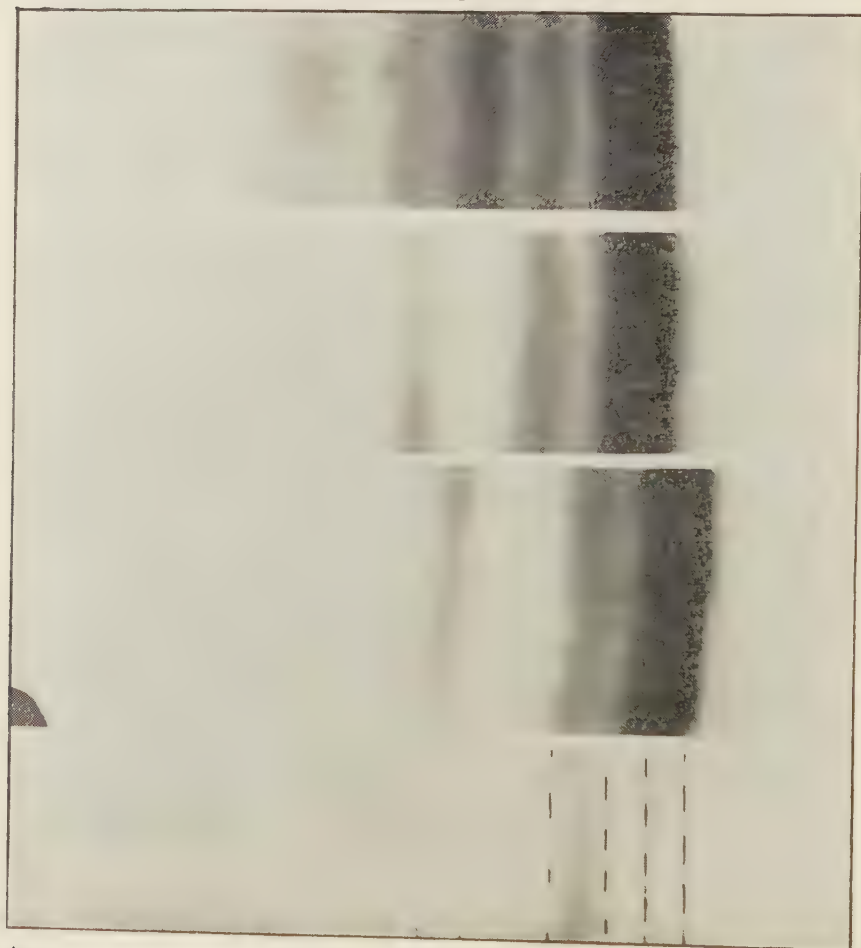
←
Sens de migration.

↑
Ligne de départ.

PLANCHE N° 8

*Electrophorèse à pH 8,6 du groupe n° 3
obtenu par relargage au sulfate d'ammonium
à la concentration de 55 à 70 %*

La bande supérieure correspond au liquide non fractionné.
Révélation des bandes supérieure et médiane à l'amidoschwarz.
Révélation de la bande inférieure par le réactif de SCHIFF.



Ligne de départ.



Sens de migration.

PLANCHE N° 9

*Electrophorèse à pH 8,6 du groupe n° 4
obtenu par relargage au sulfate d'ammonium
à la concentration de 70 à 100 %*

La bande supérieure correspond au liquide non fractionné.
Révélation des deux bandes à l'amidoschwarz.

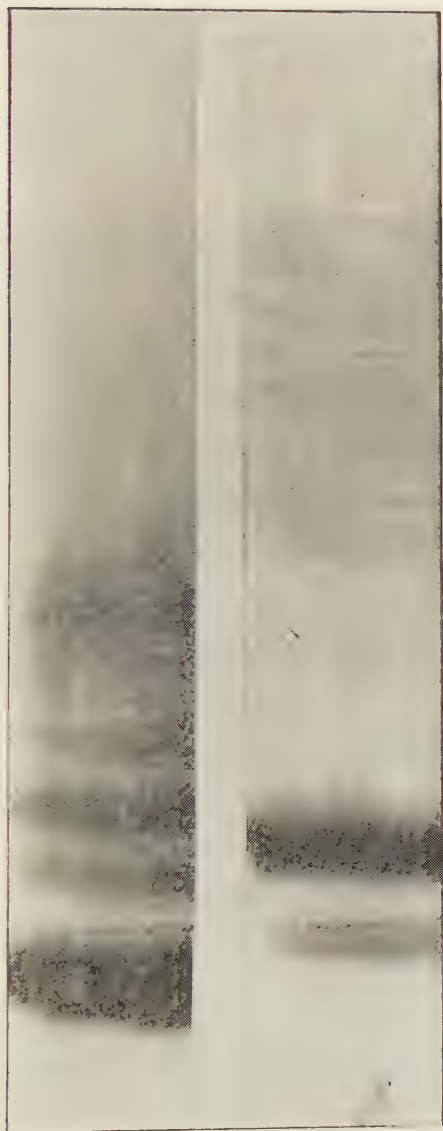
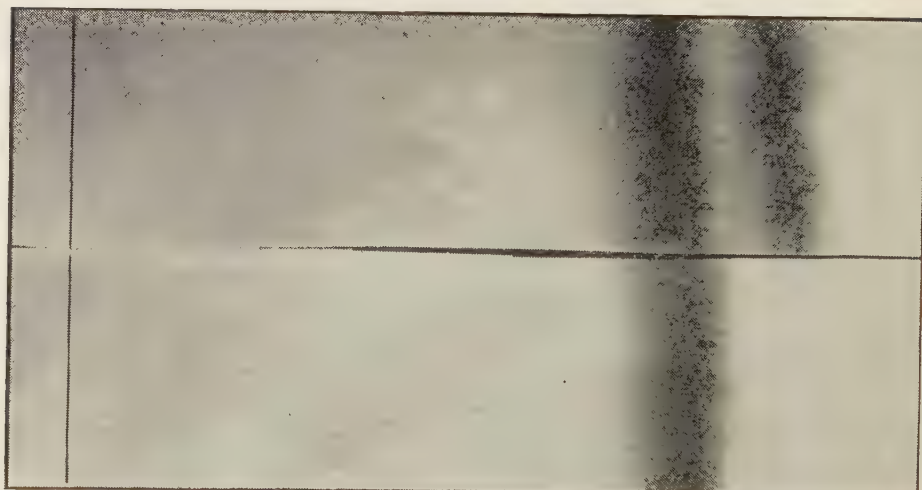


PLANCHE N° 9 bis

*Electrophorèse à pH 8,6 du groupe n° 4
obtenu par relargage au sulfate d'ammonium
à la concentration de 70 à 100 %*

Bande supérieure, révélée par l'amidoschwarz.

Bande inférieure, révélée par le réactif de SCHIFF.



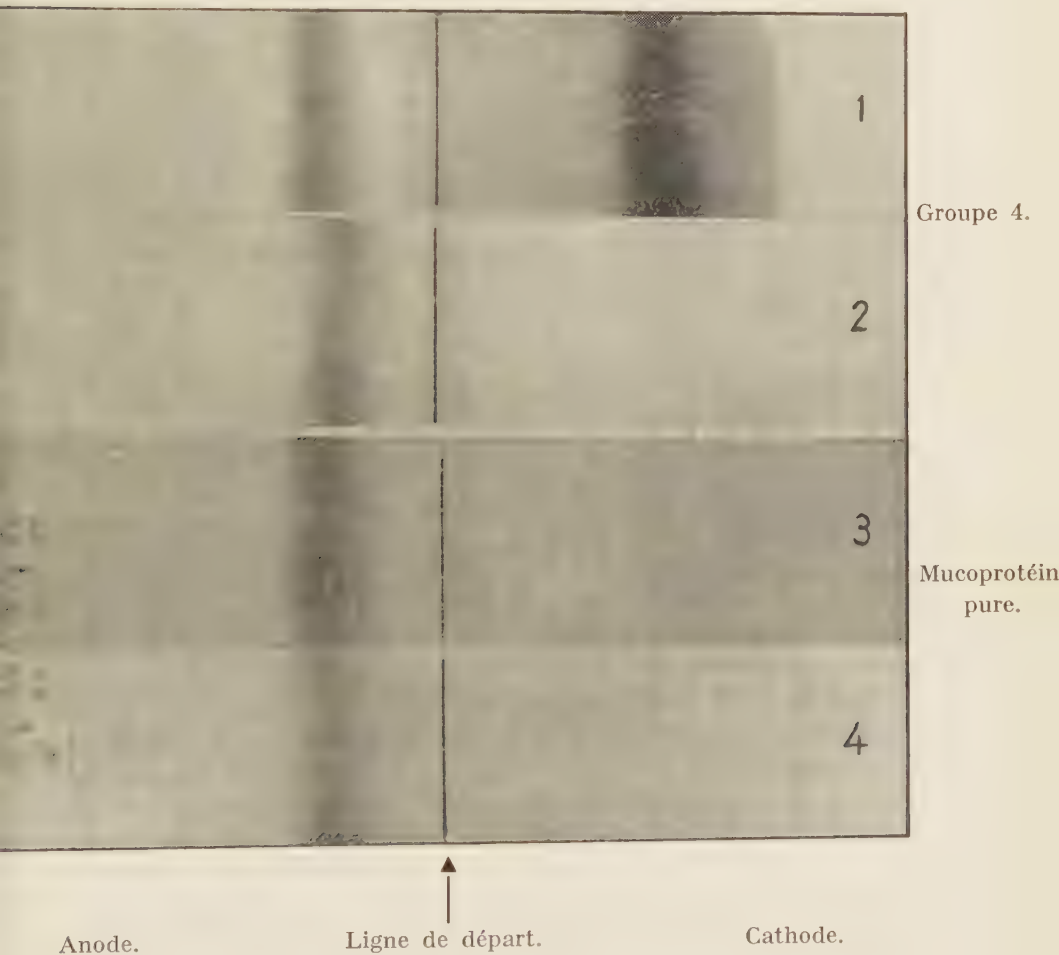
↑
Ligne de départ.

→
Sens de migration.

PLANCHE N° 10

*Electrophorèse à pH 4 du groupe n° 4
obtenu par relargage au sulfate d'ammonium
à la concentration de 70 à 100 %
et de la mucoprotéine pure
extraite de ce groupe par purification alcoolique*

Les deux bandes supérieures représentent le groupe 4.
Les deux bandes inférieures représentent la mucoprotéine.
Révélation des bandes 1 et 3 par le réactif à l'amidoschwarz.
Révélation des bandes 2 et 4 par le réactif de SCHIFF.



CHAPITRE III

PURIFICATION DU GROUPE 4

La fraction 4, lyophilisée après dialyse, est reprise par 50 ml de sérum physiologique et on lui ajoute goutte à goutte 117 ml de sulfate d'ammonium 4 M, afin d'obtenir une concentration de 70 %.

Après centrifugation, le liquide surnageant est dialysé et lyophilisé. On constate que cette purification augmente le pourcentage des hexoses, surtout dans le liquide pleural n° 6, et que les protéines précipitées correspondent principalement à l'albumine (tableau 15).

TABLEAU N° 15

*Purification de groupes 4, provenant de deux exsudats pleuraux
par relargage au sulfate d'ammonium
Fractions obtenues par précipitation entre 70 et 100 %
Dosage des protéines par la méthode au biuret*

	Exsudat n° 1		Exsudat n° 6	
	Avant	Après	Avant	Après
Protides (en g)....	1,00	0,737	1,52	0,979
Hexoses (en mg)...	53	45	178,6	158
Rapport H/P	5,3	6,1	11,75	16,79

Plusieurs purifications par ce procédé sont nécessaires pour éliminer totalement les protéines précipitant pour une concentration en sulfate inférieure à 70 %.

Finalement, lorsque la dernière purification est effectuée, on constate par électrophorèse sur papier la présence de deux bandes et il est alors indispensable d'étudier le fonctionnement par d'autres procédés.

1. Action de l'alcool à pH 4,65.

Ce pH a été choisi, parce qu'il correspond sensiblement au point isoélectrique de l'albumine (4,7). On utilise une force ionique faible, car COHN a montré que l'albumine était précipitée par l'alcool à 40 % à la force ionique 0,01. Afin d'éviter toutes dénaturations possibles, ce fractionnement est effectué en glacière et les précipités récupérés par centrifugation à 0°.

TABLEAU N° 16

*Fractionnement alcoolique des exsudats 1 et 6
Dosage des protéines par la méthode au biuret*

Les protides sont donnés en grammes et les hexoses en mg

Concentration en alcool	Exsudat n° 1			Exsudat n° 6		
	Protides	Hexoses	Rapport	Protides	Hexoses	Rapport
Départ.....	0,737	45,0	6,1	0,979	158,0	16,70
0 à 50 % ..	0,556	17,5	3,15	0,480	37,7	7,90
50 à 80 % ..	0,101	24,5	24,20	0,456	111,0	24,35

Le groupe 4, lyophilisé après la dialyse, est repris par 50 ml d'eau distillée. On en prélève 5 ml pour effectuer les dosages et les électrophorèses témoins. On fixe le pH du reste de la solution à la valeur de 4,65 en y ajoutant 2 ml de tampon acétate M et l'on complète le volume à 50 ml avec l'eau distillée (force ionique de 0,04). Le liquide est placé à la glacière pendant une nuit afin d'équilibrer la température à 0°. On ajoute alors lentement 50 ml d'alcool à 95°, refroidis à — 20°, et on centrifuge après nouveau repos d'une nuit. Le précipité est lavé par 50 ml d'alcool à 50°, puis 50 ml d'alcool absolu, enfin par 50 ml d'éther anhydre. La dessiccation est terminée sous vide en présence de chlorure de calcium.

Le liquide surnageant est ensuite amené à la concentration de 80 % en alcool, et un deuxième précipité apparaît que l'on traite comme précédemment.

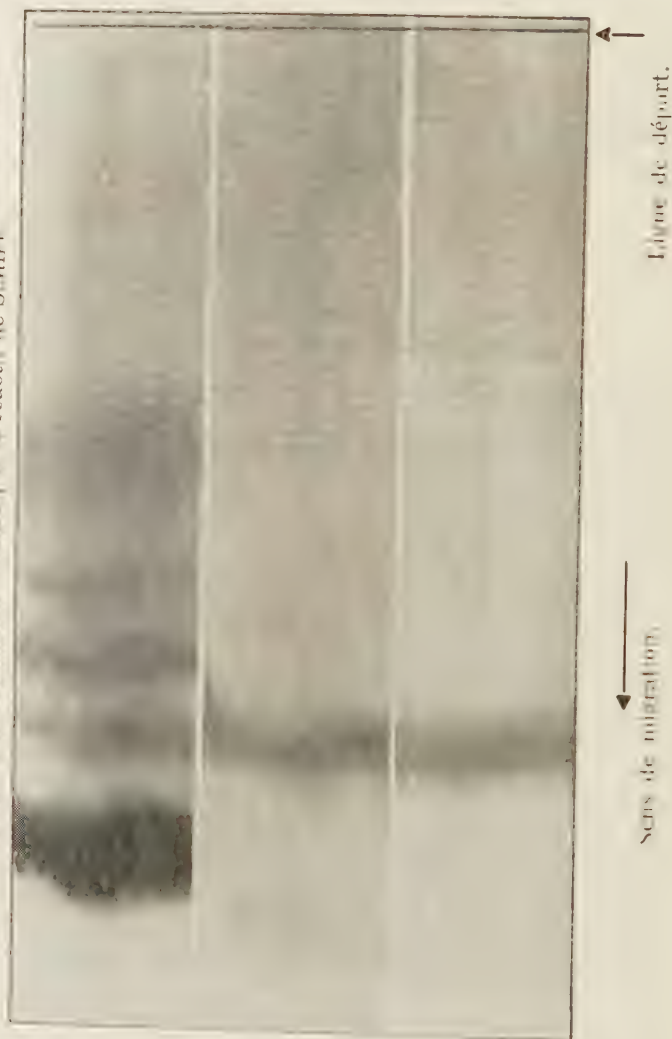
Le précipité obtenu au-delà de 50 % en alcool présente une forte concentration en hexoses liés aux protéines (tableau 16) ; l'électrophorèse à pH 8,6 donne une bande unique migrant comme une alpha 1 globuline (planche 11), mais à pH 4 la protéine se

déplace vers l'anode (planche 10) : il faut donc admettre que nous avons mis en évidence une substance ayant les caractères électrophorétiques d'une alpha 1 globuline acide, c'est-à-dire une mucoprotéine.

PLANCHE N° 11

*Electrophorèse à pH 8,8 de la mucoprotéine extraite du groupe 1
par fractionnement alcoolique au-dessus de 50 %*

La bande supérieure correspond au liquide non fractionné.
Révélation de la bande supérieure et de la médiane à l'amidoschwarz.
Révélation de la bande inférieure par le réactif de Stann



Le fractionnement alcoolique à pH 4,65 nous a permis d'obtenir un groupe très riche en sucres protidiques et présentant une seule bande à l'électrophorèse.

2. Action de l'acide perchlorique.

Par de nombreux travaux (66-35), on sait que les glycoprotéines sont très solubles dans l'acide perchlorique. Aussi, avons-nous tenté de séparer la substance par action de cet acide sur le groupe 4.

On dissout 1,34 g de protéines provenant du groupe 4, isolé de l'exsudat n° 1, et ayant un rapport H/P de 5,3, dans 100 ml de sérum physiologique. 50 ml d'acide perchlorique 1,8 M sont ajoutés goutte à goutte avec agitation douce et constante, afin d'avoir une concentration finale en acide de 0,6 M. Après repos d'une heure, le liquide est filtré sur papier Whatman 1 jusqu'à l'obtention d'une solution limpide qui, neutralisée par la soude, est dialysée contre de l'eau distillée pendant deux jours, puis lyophilisée. On obtient ainsi 350 mg de protéines avec un rapport H/P de 12,4 % et présentant une seule bande électrophorétique à pH 8 et à pH 4 (le dosage des protéines est effectué par pesée du lyophilisat).

Le traitement perchlorique a donc enrichi les substances protéiniques en oses par suite de la précipitation de l'albumine. Toutefois, le rapport H/P étant assez faible, une purification alcoolique suivant la technique décrite précédemment est alors effectuée (tableau n° 17).

TABLEAU N° 17

*Fractionnement alcoolique des protéines perchlorosolubles
séparées du groupe 4 de l'exsudat n° 1
Dosage des protéines par pesée des précipités*

Concentration en alcool	Protéines (en mg)	Rapport H/P
0 à 50 %	212	13,1
50 à 80 %	107	16,6

En résumé, le fractionnement perchlorique sur le groupe 4 est inférieur à la séparation alcoolique, puisqu'il est nécessaire de faire une purification par l'alcool après l'action de l'acide.

CHAPITRE IV

FRACTIONNEMENTS PERCHLORIQUE ET SULFOSALICYLIQUE DES LIQUIDES PLEURAUX TOTAUX

On sait qu'une méthode d'isolement des mucoprotéines est fondée sur le caractère de solubilité de celles-ci dans les acides perchlorique et sulfosalicylique. Cette technique est d'ailleurs utilisée pour doser les mucoprotéines du sérum (66). Aussi, avons-nous envisagé une préparation possible de la substance qui est le but de ce travail, par précipitation directe du liquide pleural à l'aide de ces acides.

1. *Action de l'acide perchlorique.*

Un litre d'exsudat pleural n° 7 est traité par 2 l d'acide perchlorique 1,8 M, ajouté goutte à goutte. Après filtration sur papier Whatman n° 1 et neutralisation par la soude, le liquide est dialysé 24 h contre l'eau courante, puis contre l'eau distillée changée toutes les huit heures, jusqu'à disparition totale de l'acide. Enfin, il est lyophilisé : on obtient 1.393 mg avec un rapport H/P de 10,49 (par pesée du lyophilisat).

Il est donc nécessaire de faire un fractionnement alcoolique à pH 4,65. Toutefois, après l'addition du tampon acétate, apparaît un précipité qui est éliminé par centrifugation. Le liquide surnageant est, comme précédemment, amené successivement aux concentrations de 50 et 80 % en alcool (tableau n° 18).

TABLEAU N° 18

*Fractionnement alcoolique des protéines perchlorosolubles
séparées de 1 litre d'exsudat n° 7
Dosage des protéines par pesée des précipités*

Concentration en alcool	Protéines (en mg)	Rapport H/P
0 à 50 %	572	7,31
50 à 80 %	442	15,00

Entre 0 et 50 %, le rapport H/P est faible. Aussi, pensant que l'action de l'acide perchlorique sur un liquide total était incomplète, avons-nous traité ce groupe une seconde fois par l'acide perchlorique et avons-nous obtenu un précipité. Après centrifugation, le liquide surnageant est dialysé et de nouveau traité par l'alcool (tableau 19).

TABLEAU N° 19

*Fractionnement alcoolique du groupe 0 à 50 %
séparé de l'exsudat n° 7 après une première purification à l'alcool
Dosage des protéines par pesée des précipités*

Concentration en alcool	Protéines (en mg)	Rapport H/P
0 à 50 %	417,7	9,31
50 à 80 %	18,0	15,42

Le deuxième traitement par l'acide perchlorique a donc augmenté le rapport H/P, en précipitant certaines protéines à teneur très faible en hexoses.

Les deux groupes : 50 à 80 %, sont réunis et purifiés trois fois de suite par fractionnement alcoolique. Finalement, on obtient 420 mg de protéines présentant un rapport H/P de 15,85 et donnant une seule bande électrophorétique à pH 4 et pH 8,6.

2. Action de l'acide sulfosalicylique.

Pour préparer l'orosomucoïde, ANDERSON et MAC LAGAN (1) font agir sur le sérum l'acide sulfosalicylique 0,2 M, puis l'acide phosphotungstique à 5 % dans l'acide chlorhydrique 2 N. Afin d'éviter l'action dénaturante de l'acide phosphotungstique, nous supprimons la deuxième précipitation et nous la remplaçons par un fractionnement alcoolique, sachant que l'acide sulfosalicylique et ses sels sont solubles dans l'alcool.

Un litre d'exsudat n° 8 est traité par trois litres d'acide sulfosalicylique 0,2 M, ajouté goutte à goutte avec agitation constante. Après 30 mn de contact, on centrifuge pendant une demi-heure à 5 000 tours. Le liquide surnageant limpide est neutralisé par la soude 5 N jusqu'à pH 7, puis mis à la glacière à 0° pendant 24 h. On ajoute alors 12 litres d'alcool absolu refroidi à — 20° sous agitation constante et en stabilisant la température à 0°. Après une nuit à la glacière à cette température, le précipité est recueilli par centrifugation, dissous dans 50 ml d'eau distillée et dialysé deux jours contre l'eau distillée pour éliminer toutes traces d'acide sulfosalicylique. On précipite de nouveau par l'alcool absolu jusqu'à la concentration de 80 % : on obtient 500 mg de protéines avec un rapport H/P de 11,9 et donnant une seule bande électrophorétique.

Après dissolution dans 50 ml de tampon acétate pH 4,65 et force ionique 0,04, on amène la solution aux concentrations alcooliques de 50 et 80 % (tableau n° 20).

TABLEAU N° 20

*Fractionnement alcoolique des protéines sulfosalicylosolubles
séparées de 1 litre d'exsudat n° 8
Dosage des protéines par pesée des précipités*

Concentration en alcool	Protéines (en mg)	Rapport H P
0 à 50 %	229	10,48
50 à 80 %	218	14,04

Le groupe 50 à 80 % est purifié trois fois de suite par l'alcool et l'on obtient finalement 192 mg avec un rapport H/P de 15,4.

En résumé, les acides perchlorique et sulfosalicylique nous ont permis d'obtenir la même substance que celle séparée par le fractionnement au sulfate d'ammonium. Cependant, dans tous les cas, il est nécessaire de faire une purification alcoolique et l'on constate que la mucoprotéine précipite toujours à pH 4,65 au-delà de 50 % en alcool.

La préparation de la mucoprotéine pleurale est donc basée, d'une part sur les propriétés que possède cette substance d'être soluble dans le sulfate d'ammonium à 70 % et dans les acides perchlorique et sulfosalicylique, d'autre part sur sa précipitation par l'alcool à pH 4,65 pour des concentrations de 50 à 80 %.

L'intérêt des acides perchlorique et sulfosalicylique aurait été d'obtenir une protéine pure ou très voisine de la pureté. En fait,

il n'en est rien, puisqu'il est nécessaire de procéder à une triple purification à l'alcool. Par ailleurs, cette technique implique une dialyse et un fractionnement sur des volumes considérables. Pour toutes ces raisons, nous avons choisi la méthode de relargage au sulfate d'ammonium.

CHAPITRE V

PRÉPARATION DE LA MUCOPROTÉINE PLEURALE

Un litre de liquide pleural, provenant d'un ou de plusieurs malades, est amené à la concentration de 70 % en sulfate d'ammonium par addition de 472 g de sel cristallisé. Le pH est ajusté à 7 au moyen d'ammoniaque diluée au 1/20. Après une nuit à la température ambiante, le liquide est centrifugé. Le précipité est repris par 500 ml d'une solution de sulfate d'ammonium à 70 % et centrifugé. Le liquide surnageant est décanté et ajouté au premier centrifugat. Les extraits sont saturés par des cristaux de sulfate d'ammonium avec agitation lente. Après une nuit de repos, le précipité est recueilli par centrifugation, dissous dans l'eau distillée, puis dialysé dans un boudin de cellophane contre l'eau courante et l'eau distillée jusqu'à disparition totale du sulfate d'ammonium.

Le dialysat est de nouveau traité par une solution saturée de sulfate d'ammonium en quantité telle que la concentration finale soit égale à 70 %. Après centrifugation, le liquide surnageant est saturé par le sulfate d'ammonium. Le précipité est recueilli par centrifugation, dissous dans l'eau distillée et dialysé.

Le dialysat précédent est ajusté à pH 4,65 par 2 ml de tampon acétate M et le volume amené à 50 ml pour obtenir une concentration finale en tampon de M 25. Le liquide, placé dans un tube à centrifuger de 250 ml, est mis une nuit à la glacière à 0° pour équilibrer la température. 50 ml d'alcool éthylique absolu, refroidi à -20°, sont ajoutés goutte à goutte avec agitation constante en stabilisant la température de la solution à 0°. Après repos de 12 h à cette température, le précipité est centrifugé. La solution alcoolique surnageante est amenée à 80 % par addition de 150 ml d'alcool absolu refroidi à -20°. Après repos de 12 h, le précipité est recueilli par centrifugation, lavé successivement par l'alcool absolu refroidi et l'éther anhydre froide, puis séché sous vide.

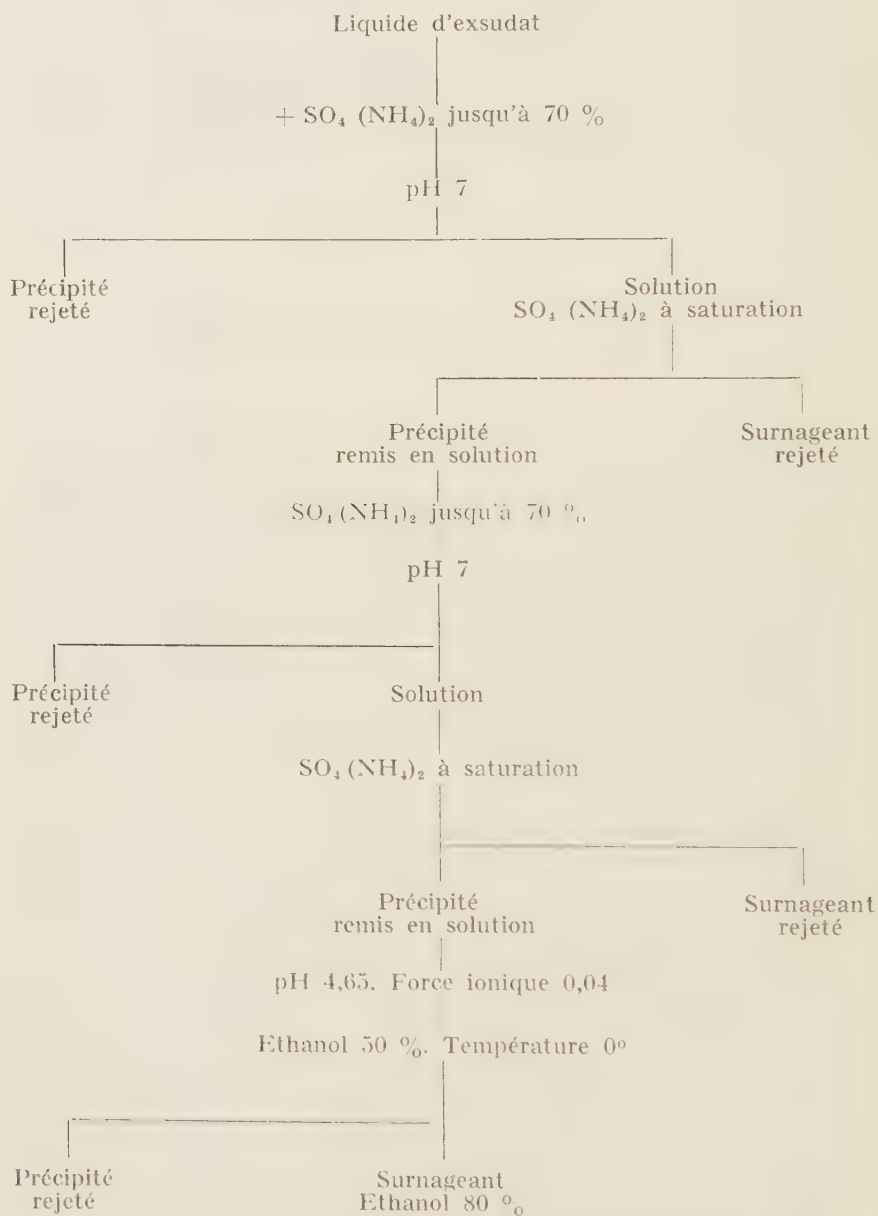
Trois purifications alcooliques sont effectuées pour obtenir la mucoprotéine à l'état pur.

Le tableau n° 21 résume les opérations concernant la préparation de la mucoprotéine pleurale.

En conclusion, nous avons séparé par relargage au sulfate d'ammonium et purification alcoolique à pH 4,65 une protéine pure, provenant de dix liquides d'exsudats pleuraux d'origine différente et présentant les caractères d'une mucoprotéine.

TABLEAU N° 21

Préparation de la mucoprotéine pleurale



MUCOPROTEINE PLEURALE

CHAPITRE VI

CARACTÈRES ANALYTIQUES DES DIVERSES MUCOPROTÉINES PURES SÉPARÉES

Les tableaux 22 et 23 donnent les caractères de précipitation et les résultats obtenus pour les dosages des différents constituants de la mucoprotéine ainsi séparée à l'état pur et provenant de dix liquides pleuraux.

On constate la grande solubilité de cette protéine et sa richesse en substances glucidiques. Signalons par ailleurs le rapport Hexoses/Hexosamines égal à 1,48, différent du rapport admis classiquement pour les mucoprotéines qui serait égal à 2. La richesse en glucides est de plus confirmée par la faible teneur en azote et en polypeptides.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence la présence des ions sulfate et phosphate et des acides uroniques.

TABLEAU N° 22

Caractères de précipitation de la mucoprotéine

Précipitants	Non précipitants
Sulfate d'ammonium 4 M après 80%	Acide perchlorique 0,6 M
Ethanol à 60 % à pH 4,65	Acide sulfosalicylique 0,2 M

TABLEAU N° 23

Constituants de la mucoprotéine

Les résultats représentent la moyenne des dosages faits sur dix échantillons.

Constituants	Pourcentage moyen
Azote total	10,13
Phosphore total	Néant
Sulfates	Néant
Protéines	56,2
Hexoses	15,72
Hexosamines	10,6
Fucose	2,2
Acide sialique	10,4
Acides uroniques	Néant
Lipides	Néant

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DE LA COPULE GLUCIDIQUE

Ayant des quantités faibles de mucoprotéine, il nous faut utiliser une méthode à la fois rapide, précise, et adaptée à la micro-analyse pour déterminer les rapports entre les différents glucides. Mais, pour pouvoir procéder à une telle détermination, il est nécessaire de la faire précéder par :

- une hydrolyse préalable, aussi quantitative que possible, pour libérer les oses liés aux protéines ;
- une détermination après chromatographie des proportions respectives des substances glucidiques ainsi libérées ;
- une chromatographie qualitative de l'acide sialique qui s'est séparée sous l'influence de la faible acidité nécessitée par l'hydrolyse.

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE DE LA LIBÉRATION PAR L'HYDROLYSE DES COMPOSÉS GLUCIDIQUES

L'identification et le dosage des oses et des osamines sont effectués sur les hydrolysats de la mucoprotéine. Aussi, l'hydrolyse doit elle être aussi totale que possible, pour pouvoir déterminer les rapports existant entre les différents composés glucidiques.

Il est donc nécessaire de faire l'étude des conditions de l'hydrolyse, car il n'existe pas de méthode générale. En effet, la concentration en acide et le temps d'hydrolyse sont fonction de la stabilité de la liaison copule glucidique-protéines et de la résistance des oses libérés à l'action des acides en tube scellé à 100°.

Si certains oses font partie de la fraction la plus stable de la molécule, d'autres, comme le fucose, font partie de la fraction la plus labile et sont libérés très rapidement. WINZLER (67), étudiant la libération des différents glucides de l'orosomucoïde après hydrolyse par l'acide chlorhydrique normal pendant des temps variables, constate que la totalité du fucose est libérée dans les quinze premières minutes.

Si les auteurs utilisent l'acide chlorhydrique pour la libération des osamines, ils préfèrent en général l'acide sulfurique pour celle des oses. Cependant, la récupération des sucres neutres n'est jamais totale. D'autre part, de très grandes divergences se rencontrent selon les auteurs quant au temps d'hydrolyse, à la nature et à la force de l'acide employé, à la concentration en glycoprotéines par rapport à l'acide utilisé.

NEUBERGER (42), RIMINGTON (50-49) et WINZLER (67), utilisent l'acide chlorhydrique 1,5 N ou N, à 100°, pour libérer les oses soit à partir des polysaccharides de l'albumine de l'œuf, soit à partir du séromucoïde : ces auteurs déterminent par la même technique la quantité d'osamines.

Dans toutes les autres techniques, l'acide sulfurique est employé pour libérer les différents glucides ; les concentrations sont très différentes et varient de 0,25 à 2 N (25, 28, 37). L'hydrolyse dure de 2 à 18 h. Mais aucun des auteurs ne donne le pourcentage de libération des oses suivant leur technique propre en fonction du temps.

Quant aux osamines, à part BISERTE (9) qui emploie l'acide sulfurique normal pendant 5 h pour hydrolyser la mucoprotéine de DONAGGIO, leur libération est toujours effectuée par l'action de l'acide chlorhydrique à différentes normalités (1 à 6 N) pendant des temps très variables. Les sucres aminés sont d'ailleurs très stables puisque la perte n'est que de 5 % après chauffage de 16 h d'une solution de glucosamine en présence d'acide chlorhydrique 1 N ; cependant, PARTRIDGE (46) constate une perte de 10 à 14 % avec la galactosamine.

Enfin, les quantités de substances hydrolysées par rapport à la quantité d'acide employé varient entre 50 et 125 mg pour 100 ml du réactif hydrolysant.

Il est donc impossible de se référer aux chiffres donnés par les différentes techniques, pour pouvoir en tirer une méthode générale d'hydrolyse des glycoprotéines, d'autant plus que ces recherches furent faites sur des produits très différents (ovomucoïde, séromucoïde acide, polysaccharides de l'albumine de l'œuf).

Toutefois, aucune étude n'a été faite sur l'action comparée des acides sulfurique et chlorhydrique à différentes concentrations et en fonction du temps, en suivant la libération des substances glucidiques.

C'est l'étude de la « cinétique » de l'hydrolyse de la mucoprotéine pleurale que nous rapportons ici, en comparant les résultats fournis après hydrolyse à ceux donnés par les dosages directs.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Les hydrolyses sont effectuées avec les acides sulfurique et chlorhydrique Fixanal.

Mode opératoire

A. — *Hydrolyse.*

10 mg de pleuromucoïde sont dissous dans 10 ml d'acide sulfurique ou chlorhydrique N, 2 N, et 4 N. La solution obtenue est utilisée pour remplir cinq ampoules de 2 ml qui sont ensuite scellées. Les hydrolyses sont effectuées au bain-marie bouillant et, après des temps variables, des échantillons sont prélevés. Chaque hydrolysate refroidi est centrifugé. On dose les osamines sur 1 ml et la quantité des substances réductrices totales sur 0,5 ml.

La faible concentration en protéines (0,10 %) est indispensable pour éviter la formation de substances « humiques ».

B. — *Techniques de dosage.*

1. *Les substances réductrices totales*, c'est-à-dire la somme des hexoses, osamines et méthylpentoses, sont déterminées par la technique de NELSON-SOMOGYI, en prenant comme référence une solution de galactose à 1 % faite avec le réactif acide utilisé pour l'hydrolyse.

Avant le dosage, le prélèvement d'hydrolysate est neutralisé par 0,5 ml de soude ayant la même normalité que l'acide utilisé.

2. *Les osamines* sont déterminées par la méthode d'ELSON et MORGAN, modifiée par BLIX, après neutralisation de l'hydrolysate par la soude en présence de phtaléine de phénol.

Ainsi, au cours de l'hydrolyse de la mucoprotéine, on pourra connaître directement la quantité d'osamines libérée et indirectement, par différence entre les substances réductrices totales et les osamines, celle des oses neutres.

RÉSULTATS

Les résultats, réunis dans les tableaux 24, 25 et 26 expriment les pourcentages des substances réductrices totales, osamines et oses neutres, libérées après un temps déterminé d'hydrolyse acide.

TABLEAU N° 24

*Pourcentages de récupération des substances réductrices totales
après hydrolyse de 10 mg de mucoprotéines*

Agents d'hydrolyse	Temps d'hydrolyse (heures)	Substances libérées (en microgrammes)	Pourcentage - de récupération
SO ₄ H ₂ N	2	1 738	61,17
	4	1 775	62,48
	6	1 887	66,44
SO ₄ H ₂ 2 N	2	2 070	72,86
	4	2 070	72,86
	6	2 130	74,97
HCl N	2	2 220	78,13
	4	2 450	86,23
	6	2 553	89,86
	8	2 573	90,56
	10	2 375	83,46
HCl 2 N	2	2 310	81,31
	4	2 380	83,77
	6	2 140	75,32
HCl 4 N	2	1 460	51,39
	4	1 350	47,51
	6	1 200	42,27

Le pourcentage de 100 correspond à la somme :

- des hexoses par le dosage à l'orcinol,
- du fucose selon DISCHE,
- et des osamines selon BLIX.

Le fucose et les osamines sont ramenés en pourcentage de galactose, sachant que le pourcentage de réduction est de 106 % pour les osamines, et de 66 % pour le fucose.

Le pourcentage de 100 correspond donc à 2 840 microgrammes de galactose, pour 10 mg de mucoprotéines.

TABLEAU N° 25

*Pourcentages de récupération des osamines
après hydrolyse de 10 mg, de mucoprotéines*

Agents d'hydrolyse	Temps d'hydrolyse (heures)	Substances libérées (en microgrammes)	Pourcentage de récupération
SO ₄ H ₂ N	2	713	67,26
	4	890	83,96
	6	890	83,96
SO ₄ H ₂ 2 N	2	919	86,7
	4	990	93,45
	6	1 010	95,29
ClH N	2	705	66,51
	4	914	86,22
	6	888	83,77
	8	949	89,52
	10	980	92,45
ClH 2 N	2	1 008	95,09
	4	1 060	100,00
	6	1 060	100,00
ClH 4 N	2	1 000	94,37
	4	1 020	96,23
	6	1 000	94,37

Le pourcentage est donné en se référant à la valeur maximum obtenue au cours de l'hydrolyse, c'est-à-dire 1 060 microgrammes de glucosamine pour 10 mg de mucoprotéines.

TABLEAU N° 26

*Pourcentages de récupération des oses neutres
après hydrolyse de 10 mg de mucoprotéines*

Agents d'hydrolyse	Temps (heures)	Corps réducteurs totaux (en gamma)	Osamines en gamma,	Oses neutres (en gamma,	Pourcentage de récupération
SO ₄ H ₂ N	2	1 738	756	982	57,19
	4	1 775	943	832	48,45
	6	1 887	943	944	54,97
SO ₄ H ₂ 2 N	2	2 070	974	1 096	63,83
	4	2 070	1 049	1 021	59,46
	6	2 130	1 071	1 059	61,68
ClH N	2	2 220	747	1 473	85,78
	4	2 450	969	1 481	86,25
	6	2 553	941	1 612	93,88
	8	2 573	1 006	1 567	91,26
	10	2 375	1 039	1 336	77,81
ClH 2 N	2	2 310	1 068	1 242	72,33
	4	2 380	1 124	1 256	73,15
	6	2 140	1 124	1 016	59,17
ClH 4 N	2	1 460	1 060	400	23,29
	4	1 350	1 081	269	15,66
	6	1 200	1 060	140	8,15

Les osamines sont déterminées en galactose, sachant que le pourcentage de réduction est de 106 %. La différence entre les corps réducteurs totaux et les osamines nous donne ainsi les oses neutres.

Le pourcentage de 100 correspond à la somme du fucose et des hexoses c'est-à-dire à 1 717 microgrammes de galactose.

DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS

L'ensemble de ces trois tableaux démontre l'importance considérable de l'étude de l'hydrolyse d'une mucoprotéine définie, en fonction tant du temps que des acides utilisés sous diverses concentrations.

En effet, on constate dans le tableau n° 26 que la quasi-totalité des oses est libérée en présence d'*acide chlorhydrique normal* pendant 6 h. Mais, l'augmentation de la concentration en acide ou du temps d'hydrolyse entraîne une destruction parfois considérable. Cette perte, importante avec l'acide chlorhydrique 2 N, s'accroît et devient presque totale avec l'acide chlorhydrique 4 N dès la deuxième heure.

Au contraire, l'*acide sulfurique*, agent hydrolysant classique, ne réalise pas une libération complète des oses puisque dans les meilleures conditions la récupération ne dépasse pas 65 %. Cependant, il ne semble pas se produire de destruction des oses avec l'acide sulfurique, car leur concentration ne s'abaisse pas.

La libération des oses par l'acide sulfurique est donc très différente de celle par l'acide chlorhydrique, mais, dans ce dernier cas, l'hydrolyse doit se faire dans des conditions parfaitement contrôlées.

Dans le tableau n° 25, on constate que la mise en liberté des osamines, maximum avec l'acide chlorhydrique 2 N pendant 4 à 6 h, peut être aussi bien réalisée avec l'acide sulfurique normal, rarement utilisé dans ce cas. Mais, contrairement à ce qui se produit avec les oses neutres, l'augmentation de la force de l'acide ou du temps d'hydrolyse n'a pas ou a peu d'effets destructeurs sur les sucres aminés.

Il n'y a donc pas une technique d'hydrolyse type valable pour toutes les mucoprotéines, mais des techniques particulières à chaque substance dans des conditions très précises.

CHAPITRE II

DÉTERMINATION QUANTITATIVE DES SUCRES NEUTRES ET DES OSAMINES APRÈS CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

L'acide chlorhydrique ayant été choisi comme meilleur agent hydrolysant, il est nécessaire d'éliminer celui-ci avant la chromatographie. De nombreux auteurs passent les hydrolysats sur des résines échangeuses d'ions, ce qui permet d'éliminer l'acide et de séparer les sucres neutres des osamines. Séparant correctement par notre technique de chromatographie (cf. voir chapitre 9, première partie) ces différentes substances, le passage sur résine a été supprimé. Quant à l'acide chlorhydrique, il peut être éliminé soit sous forme de précipité de chlorure d'argent, soit par évaporation sous vide : c'est ce dernier procédé qui a été utilisé afin d'éviter l'addition de nitrate d'argent aux extraits.

Préparation des hydrolysats

Deux extraits sont préparés par dissolution de 10 mg de mucoprotéines, l'un dans 10 ml d'acide chlorhydrique normal pour les sucres, l'autre dans 10 ml d'acide chlorhydrique 2 N pour les osamines. Ils sont introduits dans des ampoules de 10 ml qui sont scellées. L'hydrolyse est effectuée dans un bain-marie bouillant à 100° pendant 6 h. Après refroidissement, chaque hydrolysate est centrifugé et l'on décante l'extrait chlorhydrique. Le dépôt noirâtre est lavé par quelques millilitres d'eau distillée et de nouveau centrifugé. Les extraits sont évaporés à froid sous courant d'air et repris par du méthanol ; on évapore et on répète trois fois de suite cette opération, ce qui permet d'éliminer complètement les traces d'acide chlorhydrique. Finalement, l'extrait est repris par du méthanol et évaporé sous vide dans un petit tube à hémolyse. Il est dissous dans 100 microlitres d'eau distillée. De cette façon, nous obtenons l'« extrait sucre » et l'« extrait osamine ».

Les chromatogrammes sont préparés suivant la technique précédemment décrite, mais un témoin est toujours préparé en plaçant 10 microlitres d'extrait sur un carré de papier, pour permettre le contrôle de l'hydrolyse et des chiffres donnés en sucres et en osamines par rapport à l'extrait total.

RÉSULTATS

Chromatographie qualitative comparative

(Planche n° 12)

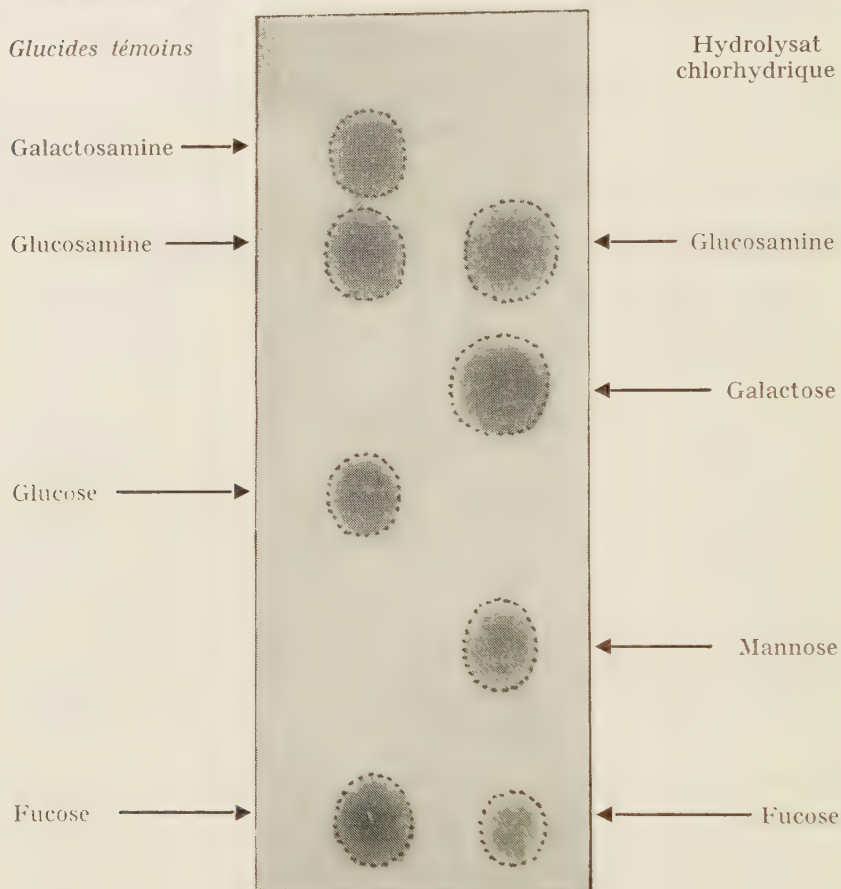
Elle fut effectuée sur les extraits de 6 liquides d'exsudats pleuraux d'origine différente.

Dans tous les cas soumis à l'examen, on constate :

- la présence d'une seule osamine : la glucosamine,
- l'absence totale de glucose,
- la présence de trois sucres :
 - 2 hexoses : le galactose,
le mannose,
 - 1 seul méthylpentose : le fucose.

PLANCHE N° 12

*Chromatographie qualitative des glucides
libérés par hydrolyse chlorhydrique d'une mucoprotéine pleurale*



Papier Schleicher 2 043 *b* lavé aux acides.
Solvant : Butanol/pyridine/ClH 0,10 N (5 : 3 : 2).
Durée : 16 h.
Révélation : oxalate d'aniline.

Chromatographie quantitative

Elle est effectuée sur les extraits de deux mucoprotéines d'origine différente.

A. — Dosage des oses neutres.

— Mucoprotéine n° 1.

Les résultats sont réunis dans le tableau n° 27.

TABLEAU N° 27

Hydrolysats chlorhydrique de 10 mg de mucoprotéine
(Chaque bande correspond à 1 mg de protéine)

Sucres	Elution de 4 bandes chromatographiques (en microgrammes)				Moyenne des 4 bandes
	1	2	3	4	
Galactose	64	63	65	64	64,0
Mannose	61	68	61	63	63,2
Fucose ..	25	22	19	22	22,0

L'extrait total contenait 271 microgrammes de substances réductrices déterminées en galactose et 108 microgrammes de glucosamine. Les 108 microgrammes de l'osamine correspondant à 114,5 microgrammes de galactose suivant la technique de NELSON-SOMOGYI, les sucres neutres sont donc égaux à 155,6 microgrammes. Après élution, la somme des trois sucres mis en évidence est égale à 141,7 microgrammes de galactose en tenant compte que le pouvoir réducteur du fucose est de 66 %. La récupération est donc de 90,8 %.

— Mucoprotéine n° 2.

TABLEAU N° 28

Hydrolysats chlorhydrique de 10 mg de mucoprotéine
(Chaque bande correspond à 1 mg de protéine)

Sucres	Elution de 4 bandes chromatographiques (en microgrammes)				Moyenne des 4 bandes
	1	2	3	4	
Galactose	73,5	69,0	74,0	72,5	72,6
Mannose.	67,0	63,0	67,0	65,8	65,7
Fucose ..	18,7	19,5	21,0	19,7	19,7

L'hydrolysât contenait 264 microgrammes de substances réductrices totales et 107 microgrammes d'osamines. Les sucres neutres correspondent donc à 150 microgrammes de galactose. La somme des deux hexoses et du fucose étant égale à 151,5 microgrammes, la récupération est dans ce cas légèrement supérieure à 100 %.

B. — *Dosage de la glucosamine.*

Les résultats obtenus à partir des extraits des deux mucoprotéines sont réunis dans un même tableau (tableau n° 29).

On constate que la récupération de la glucosamine est totale, ce qui est une preuve supplémentaire de la présence d'un seul sucre aminé.

TABLEAU N° 29

Hydrolysât chlorhydrique de 10 mg de mucoprotéine
(Chaque bande correspond à 1 mg de protéine)

	Extrait témoin	Quantités récupérées					Pourcentage de récupération
		1	2	3	4	Moyenne	
Mucoprotéine 1.	108,6	108,6	106,0	108,2	104,7	106,9	98,4
Mucoprotéine 2.	107,0	104,0	108,2	103,8	106,0	105,5	98,6

En conclusion, la récupération quasi totale des sucres neutres et aminés est une preuve supplémentaire de :

- la non-destruction de ceux-ci par le solvant ;
- la séparation parfaite des spots par chromatographie ;
- l'hydrolyse parfaitement contrôlée.

CHAPITRE III

SÉPARATION DE L'ACIDE SIALIQUE

Préparation

20 mg de mucoprotéines pleurales sont dissous dans 4 ml d'acide sulfurique 0,01 N de telle manière que le pH soit égal à 2. On chauffe une heure à 100° en tube scellé. Après neutralisation de l'hydrolysate par la soude 0,01 N, la glycoprotéine libre d'acide sialique est précipitée par addition de 1 volume d'éthanol absolu R. P. à 0°. L'extrait alcoolique est alors évaporé à froid, sous ventilation constante.

Le dosage des hexoses par la méthode à l'orcinol, du fucose selon Dische, et de l'acide sialique par la méthode à la diphénylamine est effectué tant sur l'extrait que sur le précipité de glycoprotéine.

Chromatographie

Afin de déterminer la nature de l'acide sialique libéré, une chromatographie sur papier est effectuée après purification par passage sur colonne échangeuse d'ions.

L'extrait brut, obtenu après hydrolyse sulfurique, est passé sur Dowex 2, 200 à 100 mesh, forme formiate, lavée à l'eau distillée (colonne de 0,9 cm $\times$ 25 cm). Après passage de l'extrait, la colonne est lavée à l'eau distillée pour éliminer les sucres neutres. Par élution successive par les acides formiques 0,1 N et 0,3 N, on obtient un produit présentant une réaction d'EHRlich positive. L'éluat, évaporé sous ventilation, est dissous dans 100 microlitres d'eau distillée. 1 ml de méthanol anhydre est ajouté et la solution est transvasée dans un petit tube à centrifuger. Par addition de 1 ml d'éther anhydre, un précipité se forme et est éliminé par centrifugation. On ajoute au liquide surnageant 5 ml d'éther anhydre. Après repos d'une heure au frigidaire, le précipité d'acide sialique est recueilli par centrifugation et desséché sous vide. Il est repris par 30 microlitres d'eau distillée et placé sur le papier Schleicher

2 013 b lavé aux acides. Une chromatographie descendante dans le solvant choisi est effectuée pendant 24 h ; après séchage, les bandes sont révélées par l'orcinol trichloracétique.

Résultats

1. — Dosage de l'extrait brut.

On constate que l'hydrolyse sulfurique libère non seulement l'acide sialique, mais aussi une partie des hexoses et du fucose (tableau n° 30).

TABLEAU N° 30

*Hydrolyse de 20 mg de mucoprotéines
par 4 ml d'acide sulfurique 0,01 N.*
(Les chiffres sont donnés en microgrammes)

Substances	Mucoprotéine non hydrolysée	Mucoprotéine après hydrolyse	Extrait brut
Fucose	440	240	200
Hexoses	3 454	2 864	252
Acide sialique .	1 980	238	1 708

2. — Chromatographie.

L'extrait brut, par révélation à l'oxalate d'aniline, donné une tache de fucose. Il est impossible de mettre en évidence le galactose et le mannose.

Après purification par le méthanol et l'éther, on constate la présence d'un seul spot, correspondant à l'acide N-acétylsialique.

CONCLUSION

L'hydrolyse sulfurique à très faible normalité libère 86,2 % d'acide sialique, mais 12 % de cet acide restent dans le précipité de glycoprotéine.

Il est intéressant de constater que 7,3 % des sucres neutres et que 45 % du fucose sont déjà libérés, ce qui confirme les travaux de WINZLER (67) qui remarque la libération du fucose et d'une partie du galactose pour des concentrations très basses en acide.

La liaison entre l'acide sialique et la chaîne polypeptides-hexoses est donc très labile et permet d'admettre la position terminale de cet acide.

Quant au fucose, sa libération facile par les acides chlorhydrique ou sulfurique 0,01 N peut s'expliquer soit par sa position terminale sur la mucoprotéine, soit par sa forme peut-être furanosique.

Les hexoses ne sont pas mis en évidence après chromatographie : l'acide chlorhydrique 0,01 N a donc libéré un polysaccharide, car, après hydrolyse de l'extrait brut par l'acide chlorhydrique normal, on retrouve sur les chromatogrammes le galactose et le mannose.

CHAPITRE IV

COMPARAISON DE LA MUCOPROTÉINE PLEURALE ET DE DIVERS SÉROMUCOIDES CONNUS

Les caractères de précipitabilité, étant établis et la composition chimique et l'étude de la copule glucidique étant faites, il nous est maintenant possible de comparer cette mucoprotéine pleurale aux diverses substances voisines, isolées suivant des procédés différents par K. MAYER (72), WINZLER (67), SCHMID (53), ODIN et WERNER (44) et YAMASHINA (70).

Ces protéines présentent toutes les mêmes caractères de précipitabilité :

- solubles dans les acides perchlorique 1,8 M et sulfosalicylique 0,6 M, dans l'acide trichloracétique à 20 %,
- solubles dans le sulfate d'ammonium à 80 % de saturation,
- précipitées par le sulfate d'ammonium à saturation, par l'alcool à 75 % à pH 4,5 et par l'acide phosphotungstique à 5 %.

Toutefois, si la copule glucidique représente environ 40 % de la molécule, la composition chimique est assez différente suivant les substances étudiées par les auteurs cités précédemment (tableau n° 31).

TABLEAU N° 31

*Composition chimique de la copule glucidique
de diverses mucoprotéines isolées du sérum
et de la mucoprotéine pleurale
(Résultats donnés en pourcentage)*

	Azote	Fucose	Hexoses	Osamines	Acide sialique	Acides uroniques
K. MEYER ..	8,1		23,3	13,8		
WINZLER	10,1	1,3	16,4	11,9	10,6	Néant
K. SCHMID ..	10,7		17,2	11,5		
ODIN et WER- NER			14,1	11,5	10	
YAMASHINA ..			14,2	12,3	10,8	
Mucoprotéine pleurale ..	10,13	2,2	15,76	10,6	10,4	Néant

Excluant le manque de spécificité des dosages, on peut penser que ces différentes préparations ne sont peut être pas pures ou bien que l'orosomucoïde n'est pas une entité définitive mais se trouve formé de deux ou plusieurs protéines en proportions variables. Cette conclusion est surtout valable pour le séromucoïde de K. MEYER dont le pourcentage d'hexoses très élevé et le taux d'azote très faible ne sont pas en accord avec les valeurs des préparations de SCHMID et de WINZLER. Ces deux dernières sont très voisines, comme nous l'a confirmé ce dernier auteur (communication personnelle). Les différences qu'elles présentent sont sans doute dues au fait que l'alpha I glyco-protéine de SCHMID est cristallisée sous forme de sel de plomb et que le point isoélectrique de l'orosomucoïde a été déterminé dans un tampon trichloracétate.

Enfin, les préparations de YAMASHINA, ODIN et WERNER, faibles en hexoses, sont malheureusement incomplètement caractérisées et ne peuvent pas être comparées aux autres produits.

La mucoprotéine isolée des exsudats pleuraux se rapproche très nettement de l'alpha I glycoprotéine et de l'orosomucoïde

par ses caractères de solubilité et par la composition chimique de sa copule glucidique. Il y a donc similarité, mais y a-t-il identité ? Il faut en effet noter quelques divergences chimiques, et les propriétés physiques actuellement déterminées, mais dont nous n'avons pas parlé ici, se révèlent assez éloignées des deux séro-mucoïdes. Peut-être, la technique immunochimique pourra-t-elle apporter une solution à cet important problème.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La première partie de ce travail est consacrée à l'étude des différentes techniques, indispensables pour suivre le fractionnement des liquides pleuraux et pour déterminer la composition chimique de la copule glucidique d'une mucoprotéine.

En comparant par électrophorèse sur papier les pourcentages respectifs des protéines, du sérum normal et du liquide pleural, on constate que dans cette dernière humeur la frontière des alpha 2 globulines est plus élevée, celle des bêta globulines plus faible, tandis que les gamma globulines et l'albumine présentent des concentrations identiques à celles du sérum normal. Le rapport hexoses/protéines est en général supérieur à 2. En outre, par électrophorèse sur papier à pH 4 et par action de l'acide perchlorique, il est possible de mettre en évidence la présence de mucoprotéines dans le liquide pleural.

Dans la deuxième partie, nos travaux personnels ont porté sur l'isolement d'une des mucoprotéines pleurales. Par la technique de relargage au sulfate d'ammonium, plusieurs fractions protéiniques ont été obtenues, dont les rapports entre les glucides et les protéines sont variables et dont une seule (70 à 100 % de saturation en sulfate d'ammonium) est riche en hexoses et se déplace vers l'anode à pH 4. Ces deux derniers caractères étant spécifiques des mucoprotéines, un isolement a été entrepris en se fondant sur la grande solubilité de ces protéines dans les acides perchlorique et sulfosalicylique. Quelle que soit la technique de fractionnement utilisée, on obtient une fraction hétérogène que l'on purifie par précipitation alcoolique à différentes concentrations et à pH 4,65. Pour une concentration en alcool supérieure à 50 %, on isole une protéine pure à l'électrophorèse à pH 4 et pH 8,6. Ainsi, par fractionnement et purification alcoolique successifs contrôlés, une mucoprotéine a été séparée de tous les exsudats étudiés.

Après avoir éliminé la présence des ions sulfate et phosphate, des acides uroniques, et avoir constaté la faible teneur en polypeptides mise en évidence par le biuret (55 %) et l'azote (10,1 %), une étude complète de la copule glucidique a été effectuée, étude de grande importance puisque celle-ci correspond à 40 % de la molécule.

Deux conditions étaient toutefois nécessaires pour le succès de cette investigation :

- la première, la réalisation d'une libération totale des substances glucidiques liées aux protéines. Ce fait pose le problème d'une étude des conditions d'hydrolyse de la mucoprotéine. Dans le cas particulier qui nous intéresse, nous constatons que l'acide chlorhydrique se révèle un agent hydrolysant supérieur à l'acide sulfurique. Ceci est sans doute due à la présence des glucides sous forme pyranosique. Cependant, le fucose est libéré par l'acide chlorhydrique N/100 : il doit être placé en bout de chaîne ou peut-être est-il sous forme furanosique ?
- La deuxième condition est la séparation quantitative des divers constituants glucidiques par chromatographie sur papier. A l'aide d'un système solvant mis au point par nous et en employant le papier Schleicher 2 043 *b* lavé aux acides, nous avons pu déterminer sur un même chromatogramme la concentration respective de chaque glucide avec un rendement voisin de 100 %. La principale difficulté était la séparation des deux osamines et leur récupération totale. Les solvants pyridiniques donnant une destruction partielle des sucres aminés, il nous fut possible de remédier à cette perte par l'addition d'une certaine quantité d'acide chlorhydrique au solvant.

Dans l'hydrolysât de la mucoprotéine étudiée, nous avons mis en évidence l'acide N-acétylsialique, la glucosamine, le galactose, le mannose, et le fucose.

Si le fucose est pris comme référence, on constate qu'à une molécule de ce méthylpentose correspondent 6,6 molécules d'hexoses (mannose et galactose à parties égales vraisemblablement), 4,4 molécules de glucosamine et 2 molécules d'acide N-acétylsialique.

Il est particulièrement intéressant de noter l'accord parfait qui existe entre les dosages effectués sur la mucoprotéine entière et sur les substances glucidiques isolées par chromatographie.

Finalement, nous avons tenté de comparer la protéine isolée des liquides pleuraux de celles qui sont séparées du sérum. A l'heure actuelle, il nous est impossible de conclure à l'identité ou à la différence d'origine de ces substances.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ANDERSON (A. J.) et Mac LAGAN (N. F.), *Biochem. J.*, 1955, **59**, 1.
2. ARDREY (R.), Le fractionnement des protéines plasmatiques. *Biologie Médicale*, 1955, 662-766.
3. BIERRY (H.), *CR Soc. Bio.*, 1928, **99**, 1837.
4. BIERRY (H.), *CR Acad. Sci.*, 1930, **191**, 1381.
5. BIERRY (H.), *CR Acad. Sci.*, 1931, **192**, 240.
6. BIERRY (H.), *CR Soc. Bio.*, 1934, **116**, 702.
7. BIERRY (H.) et COLL., *C.R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 856 et 1454.
8. BIERRY (H.) et RATHERY (F.), *Introduction à la Physiologie des sucres*.
9. BISERTE (G.), TAYEAU (F.), MONTREUIL (J.) et DAUTREVAUX (M.), *Clin. Chim. Acta*, 1956, **1**, 115.
10. BLIX (G.), *Acta Chem. Scand.*, 1948, **2**, 467.
11. BOAS (N. F.), *J. Biol. Chem.*, 1953, **204**, 553.
12. BOURRILLON (R.), *Thèse de Médecine*, 1951.
13. BRIGGS, *J. Biol. Chem.*, 1924, **59**, 255.
14. COHN (E.-J.) et COLL., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 465.
15. COURTOIS (J.-E.), Quelques acquisitions récentes dans le domaine de l'analyse des glucides, dans *Mises au point de Chimie analytique*. Quatrième série, 1956.
16. DEDONDER (R.), Glucides et Composés voisins, dans *Numéro spécial de la journée de la Chromatographie sur papier*. *Bull. Soc. Chim. Fran.*, 1952, 874.
17. DEICHMAN (W.), *J. Lab. Clin. Med.*, 1943, **28**, 770.
18. DEISS et HOLMES (L. B.), *J. Clin. Investig.*, 1958, **37**, 51.
19. DISCHE (Z.), *Biochem. Z.*, 1928, **201**, 74.
20. DISCHE (Z.) et SHETTLES (L. B.), *J. Bio. Chem.*, 1948, **175**, 595.
21. DISCHE (Z.) et OSNOS (M.), *Fédération Proc.*, 1952, **11**, 202.
22. ELSON (L. A.) et MORGAN (W. T. J.), *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1892.
23. FLOOD (A. E.), HIRST (E. L.) et JONES (J. K. N.), *J. Chem. Soc.*, 1948, 1679.
24. FOLIN (O.) et CIOCALTEU (V.), *J. Biol. Chem.*, 1927, **73**, 627.
25. GARDELL (S.), *Acta. Chem. Scand.*, 1953, **7**, 207.
26. GORNALL (A. C.), BARDAWILL et DAVID, *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 751.
27. GOTTSCHALK (A.), *Nature*, 1952, **170**, 662.
28. GOTTSCHALK (A.) et ADA (G. L.), *Biochem. J.*, 1956, **62**, 681.
29. GROULADE et COLL., L'électrophorèse sur papier, *Biol. Méd.*, 1956.
30. KLEVSTRAND (R.) et NORDAL (A.), *Acta Chem. Scand.*, 1950, **4**, 1320.
31. KINGLEY (G. R.), *J. Biol. Chem.*, 1939, **131**, 197.
32. KOIW (E.) et GRONVALL, *Scand. J. Clin. Investig.*, 1952, **4**, 244.
33. KOIW (E.), Paperélectrophorésis, dans *Ciba Foundation Symposium*, 1956.
34. LOWRY (O. H.), ROSEBROUGH (N. J.), FARR et RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.

35. JAYLE (M. F.) et BOUSSIER (G.), Les Séromucoïdes du sang, dans *Exposés annuels de Biologie Médicale*. Série 17, 1955.
36. LUSTIG (B.) et LANGER (A.), *Biochem. Z.*, 1931, **242**, 320.
37. MASAMUNE (H.) et YOSIZAWA (Z.), *Tohoku J. Exptl. Med.*, 1950, **53**, 155.
38. MASAMUNE (H.) et YOSIZAWA (Z.), *Tohoku J. Exptl. Med.*, 1955, **64**, 53.
39. MONTREUIL (J.), *Les glycoprotéines*.
40. MUNIER (R.), Bases azotées et Acides organiques hydrosolubles dans *Numéro spécial de la Journée de la Chromatographie sur papier*. *Bull. Soc. Chim. France*, 1952, 852.
41. NELSON (N.), *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 375.
42. NEUBERGER (A.), *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1435.
43. NIAZI (S.) et STATE (D.), *Cancer Research.*, 1948, **8**, 653.
44. ODIN (L.) et WERNER (I.), *Acta. Soc. Méd. Upsala*, 1952, **57**, 227.
45. PARTRIDGE (S. M.), *Biochem. Soc. Symp.*, 1949, n° 3.
46. PARTRIDGE (S. M.) et DAVIS (H. K.), Chondroïtin Sulfate Complex in cartilage, dans *Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*. *Ciba Symposium*, 1958.
47. RIEGLER (E.), *Z. Anal. Chem.*, 1914, **53**, 242.
48. RIMINGTON (C.), *Biochem. J.*, 1929, **23**, 430.
49. RIMINGTON (C.), *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1062.
50. RIMINGTON (C.), *Biochem. J.*, 1940, **34**, 931 et 942.
51. ROBINSON (H. W.) et HOGDEN (C. G.), *J. Biol. Chem.*, 1940, **135**, 707.
52. ROMANI (J. D.), Les Glycoprotéines et Inflammation, dans *Biologie Médicale*, 1956, n° 1, 74.
53. SCHMID (K.), *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 60.
54. SCHMID (K.), ROSA (E.) et Mac NAIR (M. B.), *J. Bio. Chem.*, 1956, **219**, 769.
55. SOMOGYI (M.), *J. Biol. Chem.*, 1945, **160**, 62.
56. SVENNERHOLM (L.), *Arkiv för Kemi.*, 1956, **44**, 577.
57. SVENNERHOLM (L.), *Nature*, 1958, **181**, 4616.
58. WALDRON (D. M.) et WOODHOUSE (D. L.), *Nature*, 1950, **166**, 186.
59. WALDRON (D. M.), *Nature*, 1952, **170**, 461.
60. WEICHELBAUM (T. E.), *Amer. J. Clin. Pathol. Sup.*, 1946, **7**, 40.
61. WEIMER (H. E.) et MOSHIN (J. R.), *Amer. Rev. Tuberculosis*, 1952, **68**, 594.
62. WEIMER (H. E.), MEHL (J. W.) et WINZLER (R. J.), *J. Biol. Chem.*, 1950, **185**, 561.
63. WERNER (I.), *Acta Chem. Scand.*, 1951, **5**, 1396.
64. WERNER (I.) et ODIN (L.), *Experientia.*, 1949, **5**, 233.
65. WERNER (I.) et ODIN (L.), *Acta. Soc. Med. Upsala*, 1952, **57**, 230.
66. WINZLER (R. J.), Détermination of sérum glycoprotéine dans *Glick (D.) Methods of Biochemical analysis*, 1955, vol. 2.
67. WINZLER (R. J.), Glycoprotéins of Plasma dans *Chemistry and Biology of mucopolysaccharides*. *Ciba Fondation Symposium*, 1958.
- 67 bis. WINZLER (R.-J.), *Communication personnelle*.
68. ZANETTI (C.), *Ann. Chim. Farm.*, 1897, **12**, 1.
69. ZANETTI (C.), *Gazz. Chim. Ital.*, 1903, **33**, 160.
70. YAMASHINA (I.), *Acta. Chem. Scand.*, 1956, **10**, 1666.
71. TOLLENS (B.) et LEFEVRE (K. U.), *Ber.*, 1907, **40**, 4513.
72. MAYER (K.), *Z. physiol. Chem.*, 1942, **275**, 16.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	13
PLAN DE TRAVAIL	16

PREMIÈRE PARTIE

Techniques Expérimentales

CHAPITRE I. — Analyse élémentaire	17
CHAPITRE II. — Dosages des Protéines	18
Méthode dite du Biuret	18
Méthode de Lowry	20
CHAPITRE III. — Dosages des Hexoses	22
Méthode de Lustig et Langer	23
Méthode de Nelson-Somogyi	25
CHAPITRE IV. — Dosage des Méthylpentoses	27
CHAPITRE V. — Dosage des Osamines	30
CHAPITRE VI. — Dosages de l'Acide sialique	32
Méthode de Svennerholm	32
Méthode à la Diphénylamine	33
CHAPITRE VII. — Dosage des Acides uroniques	35
CHAPITRE VIII. — Electrophorèses	37
Protéinogrammes	38
Glucidogrammes	38
CHAPITRE IX. — Chromatographie	41

DEUXIÈME PARTIE

Fractionnement des Liquides Pleuraux

CHAPITRE I. — Liquides pleuraux totaux	57
CHAPITRE II. — Relargage par le Sulfate d'ammonium	65
CHAPITRE III. — Purification du groupe 4.	76
Action de l'alcool	77
Action de l'acide perchlorique	79

CHAPITRE IV. — Fractionnements perchlorique et sulfosalicylique	80
CHAPITRE V. — Préparation de la Mucoprotéine	84
CHAPITRE VI. — Caractères analytiques	87

TROISIÈME PARTIE

Etude de la Copule glucidique

CHAPITRE I. — Hydrolyse de la mucoprotéine	89
CHAPITRE II. — Détermination quantitative des sucres neutres et des osamines après chromatographie sur papier	96
CHAPITRE III. — Séparation de l'acide sialique	101
CHAPITRE IV. — Comparaison des divers séromucoïdes	104
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	107

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

L'ÉRYTHROPOÏÉTINE

**Vu et approuvé :
le 12 Janvier 1959**

Le Doyen
de la Faculté de Pharmacie
René FABRE

**Vu et Permis d'imprimer :
Paris, le 13 Janvier 1959**

Le Recteur
de l'Académie de Paris
Jean SARRAILH

Imprimerie P. CHAUMEIL - 44, Rue Bernard-Palissy - TOURS - 4-1959
